

ENDOTHELIALE WIRKMECHANISMEN VON REKOMBINANTEM AKTIVIERTEM PROTEIN C

ADRIANE SCHULZE NAHRUP

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der Justus-Liebig-Universität Giessen

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Roth

und

**aus der I. Medizinischen Klinik der Fakultät für Klinische Medizin Mannheim der
Universität Heidelberg**

Betreuerin: PD Dr. Martina Brückmann

Endotheliale Wirkmechanismen von rekombinantem aktiviertem Protein C

- Am Beispiel von Fractalkine,

Transforming Growth Factor-beta 2 und Cyclooxygenase-2

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

ADRIANE SCHULZE NAHRUP

Tierärztin aus Münster (Westfalen)

Gießen 2007

**Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Dekan: Professor Dr. M. Reinacher

Gutachter/in:

Prof. Dr. Joachim Roth

PD Dr. Martina Brückmann

Tag der Disputation: 31. Mai 2007

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1: Einleitung

1.1.	Sepsis	19
1.1.1.	Geschichte der Sepsis.....	19
1.1.2.	Definition der Sepsis	21
1.1.3.	Pathogenese der Sepsis	22
1.1.4.	Inzidenz der Sepsis.....	25
1.1.5.	Therapie der Sepsis	25
1.2.	Aktiviertes Protein C	27
1.2.1.	Antikoagulatorische Wirkung von APC	28
1.2.2.	Profibrinolytische Wirkung von APC.....	31
1.2.3.	Indirekte und direkte anti-inflammatorische Wirkung von APC.....	32
1.2.4.	Antiapoptotische Wirkmechanismen von APC	34
1.2.5.	Rezeptoren für APC	35
1.2.6.	APC in der Behandlung der Sepsis	36
1.3.	Fractalkine	37
1.4.	Transforming Growth Factor β2.....	40
1.5.	Cyclooxygenase-2	42
1.6.	Fragestellung der wissenschaftlichen Arbeit.....	44

Kapitel 2: Material und Methoden

2.1. Zellkultur	45
2.1.1. Humane Endothelzellen aus der Vena umbilicalis (HUVEC) – Anlegen einer Primärkultur.....	45
2.1.2. Kultivieren und Passagieren von Endothelzellen.....	46
2.1.3. Durchführen der HUVEC-Experimente.....	46
2.2. Affymetrix® GeneChip Expressions Array.....	48
2.2.1. Isolierung von Gesamt-RNA	49
2.2.2. Synthese doppelsträngiger cDNA aus RNA	50
2.2.3. Aufreinigung von ds-cDNA.....	50
2.2.4. Synthese Biotin-markierter cRNA durch In-Vitro-Transkription (IVT)	51
2.2.5. Aufreinigung von cRNA.....	51
2.2.6. Fragmentierung von Biotin-markierter cRNA.....	51
2.2.7. Hybridisierung der Proben mit dem Array	52
2.2.8. Waschen und Markieren der Array-Chips	52
2.2.9. Scannen der Array-Chips und Auswertung	52
2.3. Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (rtPCR).....	55
2.3.1. Isolierung von Gesamt-RNA	55
2.3.2. Reverse Transkription	55
2.3.3. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	56
2.3.4. Gelelektrophorese.....	58
2.3.5. Densitometrie	59

2.4.	Enzym-linked immunosorbent assay (ELISA).....	60
2.4.1.	Fractalkine Immunoassay	62
2.4.2.	Transforming Growth Factor- β 2 Immunoassay.....	62
2.4.3.	6-keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$ Immunoassay	63
2.5.	Colorimetrischer mRNA-Quantifizierungs-Assay.....	64
2.6.	Western Blot	65
2.6.1.	Vorbereitung der Zellen und Zellernte.....	65
2.6.2.	Vorbereitung der Proben	66
2.6.3.	Proteinbestimmung	66
2.6.4.	Durchführung des Western Blots	67
2.7.	Material.....	69
2.7.1.	Kulturmedium	69
2.7.2.	Substanzen, Reagenzien und Chemikalien	69
2.7.3.	Plastikwaren und Glaswaren.....	72
2.7.4.	mRNA-Präparation	73
2.7.5.	Affymetrix® GeneChip Expressions Array.....	73
2.7.6.	Elisa-Kits.....	74
2.7.7.	Colorimetrischer mRNA-Quantifizierungs-Assay.....	74
2.7.8.	Western Blot	75
2.7.9.	Geräte	75
2.7.10.	Computerprogramme	76
2.7.11.	Statistik.....	77

Kapitel 3: Ergebnisse

3.1.	Zellmorphologie von HUVEC.....	78
3.2.	Affymetrix® GeneChip Expressions Array.....	79
3.3.	Fractalkine.....	81
3.3.1.	Wirkung von rhAPC auf die Fractalkine-mRNA-Expression	81
3.3.2.	Wirkung von rhAPC auf die endotheliale Fractalkine-Freisetzung.....	83
3.3.2.1.	Dosisabhängigkeit.....	83
3.3.2.2.	Zeitabhängigkeit.....	84
3.3.3.	Wirkung von Protein C auf die endotheliale Fractalkine-Freisetzung.....	86
3.3.4.	Untersuchungen zur Beteiligung des Protease aktivierbaren Rezeptors-1 (PAR-1).....	87
3.3.4.1.	Aktivierung des Protease-aktivierbaren Rezeptors-1 mittels PAR-1-Agonist.....	87
3.3.4.2.	Wirkung von PAR-1- und PAR-2 Antagonisten auf die Fractalkine-Freisetzung.....	88
3.4.	Transforming Growth Factor-β2	90
3.4.1.	Wirkung von rhAPC auf die Transforming Growth Factor-β2- mRNA-Expression	90
3.4.2.	Wirkung von rhAPC auf die Synthese von Transforming Growth Factor-β2 ..	92

3.5. Cyclooxygenase-2	93
3.5.1. Wirkung von rhAPC auf die Cyclooxygenase-2-mRNA-Expression.....	93
3.5.1.1. Dosisabhängigkeit.....	93
3.5.1.2. Zeitabhängigkeit.....	94
3.5.2. Wirkung von rhAPC auf die Synthese von Cyclooxygenase-2-Protein	96
3.5.3. Wirkung von rhAPC auf die 6-keto-PGF _{1α} -Freisetzung	97
3.5.4. Wirkung von Protein C auf die Cyclooxygenase-2-mRNA-Expression	98
3.5.5. Wirkung von Protein C auf die 6-keto-PGF _{1α} -Freisetzung	100
3.5.6. Wirkung von Protein C und APC auf die Cyclooxygenase-1-Expression.....	101
3.5.7. Wirkung von NS-398 auf die 6-keto-PGF _{1α} -Freisetzung	102
3.5.8. Wirkung von Prostaglandin H ₂ auf die 6-keto-PGF _{1α} -Freisetzung	103

Kapitel VI: Diskussion

4.1. Anmerkungen zur Zellvitalität	105
4.2. Affymetrix® GeneChip Array	105
4.3. Fractalkine	107
4.4. Transforming Growth Factor-β2	111
4.5. Cyclooxygenase-2	113

Kapitel V: Zusammenfassung

5.	Zusammenfassung.....	117
-----------	-----------------------------	------------

Kapitel VI: Summary

6.	Summary.....	119
-----------	---------------------	------------

Kapitel VII: Literaturverzeichnis

7.	Literaturverzeichnis.....	121
-----------	----------------------------------	------------

Kapitel VIII: Anhang

8.1.	Eigene Veröffentlichungen	139
8.2.	Danksagung.....	143
8.3.	Eidesstattliche Erklärung	145

Häufig verwendete Abkürzungen:

6-keto-PGF_{1α}	6-keto-Prostaglandin F_{1α}
AP-1	Activator Protein-1
ARDS	Adult Respiratory Distress Syndrome
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	kopierte Desoxyribonukleinsäure
COX 1	Cyclooxygenase 1
COX 2	Cyclooxygenase 2
CX₃CL1	Fractalkine
CX3CR1	Fractalkine-Rezeptor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds-cDNA	doppelsträngige-kopierte Desoxyribonukleinsäure
Elisa	Enzym-linked immunosorbent assay
EPCR	Endothelialer Protein C-Rezeptor
FCS	fetales Kälberserum
FiO₂	inspiratorische Sauerstoff-Konzentration
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
IAP	Inhibitor of Apoptosis
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
IFN-γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
IVT	In-Vitro-Transkription
LAP	Latentes Assoziationsprotein
LPS	Lipopolysaccharid

LTBP	Latentes TGF-β Bindungsprotein
MIF-1	Macrophage Migration Inhibitory Factor-1
MIP-1α	Macrophage Inflammatory Protein-1α
mRNA	messenger RNA
NF-κB	Nuclear factor kappa B
PAF	Platelet activated factor
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PaO₂	arterielle Sauerstoff-Sättigung
PAR	Protease-aktivierbarer Rezeptor
PDGF	Platelet-derived growth factor
PC	Protein C
PG	Prostaglandin
PGF_{2α}	Prostaglandin F_{2α}
PGI₂	Prostacyclin
rhAPC	rekombinantes humanes aktiviertes Protein C
RNA	Ribonukleinsäure
rtPCR	reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1P₁	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-1
SK1	Sphingosin-Kinase-1
TACE [ADAM17]	TNF-α-converting Enzyme
TAFI	Thrombin –abhängiger Fibrinolyse Inhibitor
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
TGF-β2	Transforming Growth Factor-β2
TM	Thrombomodulin

TNF-α	Tumor-Necrosis-Factor-α
t-PA	tissue-Plasminogen Activator
tRNA	transfer RNA
TXA₂	Thromboxan A₂
VCAM-1	Vascular cell Adhäsionsmolekül-1
v/v%	Volumenprozent
w/v%	Gewicht pro Volumen in Prozent

Kapitel 1: Einleitung

1.1. Sepsis

Das Krankheitsbild der Sepsis ist eine häufige und meist schwerwiegende Erkrankung, zu deren Bekämpfung zahlreiche Therapien eingesetzt werden. Zu den neueren Therapieversuchen zählt der Einsatz von rekombinant hergestelltem aktiviertem Protein C (rhAPC). Trotz zahlreicher klinischer Studien sind die molekularen Wirkmechanismen des aktivierten Protein C noch nicht genau bekannt. Anhand von *in vitro* Experimenten sollen die Wege, über die APC seine positiven Effekte auf das Sepsisgeschehen ausübt, im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert werden.

1.1.1. Geschichte der Sepsis

Hippokrates (ca. 460-370 v. Chr.) führte den Begriff „Sepsis“ ein. Sepsis leitet sich aus dem Griechischen ab und bedeutet „faul machen“. Ibn Sina (970-1037) beobachtete, dass die Fäulnis des Blutes mit Fieber einhergeht. Dieses Verständnis von Sepsis wurde bis in das 19. Jahrhundert angewendet. Eine modernere Sicht entwickelte sich erst durch die Arbeit von Ignaz Semmelweis (1818-1865). Er vermutete, dass „Leichenteilchen, die in das Blutgefäßsystem gelangen“ für die Erkrankung der Wöchnerinnen verantwortlich waren. Durch die Einführung einer Händewaschung mit einer Chlorkalklösung bei den Medizinstudenten nach den Sektionsstunden und vor der gynäkologischen Untersuchung sank die Sterblichkeit deutlich ab. Trotz dieses Erfolges gelang es Semmelweis nicht, seine Hygienemaßnahmen allgemein durchzusetzen. Louis Pasteur (1822-1895) entdeckte, dass Fäulnis und Verwesung durch kleinste einzellige Lebewesen, die er als Bakterien bzw. Mikroben bezeichnete, verursacht werden. Der Chirurg Joseph Lister (1827-1912) konnte die Sterblichkeit von Patienten nach Amputationen durch den Einsatz von Haut- und

Gerätedesinfektion mit Karbolsäure dramatisch senken. Im Gegensatz zu Semmelweis konnte Lister seine Kollegen von der Sinnhaftigkeit seiner antiseptischen Verfahren überzeugen. Robert Koch (1843-1910) erweiterte dieses Wissen mit der Entwicklung der Dampfsterilisation. Den Grundstein für die heutige Sepsisdefinition lieferte 1914 Hugo Schottmüller (1867-1936): „Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden.“ Durch die Anwendung antiseptischer Verfahren kam es im beginnenden 20. Jahrhundert zu einem großen Durchbruch in der Sepsisgeschichte. Trotzdem erkrankten weiterhin Patienten an einer Sepsis, und die Sterblichkeit war noch hoch. Im Jahr 1928 wurde durch die Entdeckung Flemings (1881-1955), dass in der Umgebung von Schimmelpilzen bestimmte Bakterienkulturen geschädigt werden, das Zeitalter der Antibiotika eingeleitet. Aber erst 1940 wurde durch Florey, Chain und ihre englischen und amerikanischen Mitarbeiter das Penicillin als erstes Antibiotikum isoliert. Dadurch konnte die Sterblichkeit der Sepsis weiter verringert werden. 1967 wurde von Ashbough und Mitarbeitern bei intensivmedizinischen Patienten eine schwere Lungenerkrankung beschrieben, die aus schwerer Atemnot, Verlust der Lungendehnbarkeit und Flüssigkeitseinlagerung bestand. Diese Erkrankung wurde als Adult Respiratory Distress Syndrome (ARDS) bezeichnet und tritt häufig als Komplikation der Sepsis auf. ARDS ist die Folge einer Entzündungsreaktion und wird durch körpereigene Substanzen ausgelöst. In den achtziger Jahren wurde entdeckt, dass diese Erkrankung sich im ganzen Körper abspielt und nicht nur die Lunge betrifft. Diese Entdeckung veranlasste Roger C. Bone (1941-1997) eine neue Sepsisdefinition aufzustellen, die noch heute gültig ist: „ Sepsis ist definiert als eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion“ (Quelle: www.sepsis-gesellschaft.de).

1.1.2. Definition der Sepsis

1991 wurde von einer Konsensus-Konferenz des American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM) wichtige Begriffe in der Sepsis definiert und Sepsis anhand von klinischen Parametern eingeteilt. Sepsis wird hiernach definiert als eine von einer nachgewiesenen oder vermuteten Infektion verursachte systemische inflammatorische Reaktion (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS). SIRS ist charakterisiert durch das Vorkommen von mindestens zwei der folgenden Kriterien:

- Hypo- (<36°C) oder Hyperthermie (>38°C)
- Tachykardie (>90/min)
- Tachypnoe (>20/min) und/oder arterieller pCO₂ <4,3kPa (33mmHg) und/oder maschinelle Beatmung
- Leukozytose >12000/μl oder Leukopenie <4000/μl und/oder Linksverschiebung >10% im Differentialblutbild

Tritt konsekutiv eine durch Sepsis induzierte Organdysfunktion mit mindestens einem der folgenden Kriterien auf, so wird dies als schwere Sepsis bezeichnet:

- Akute Enzephalopathie
- Thrombozytopenie <100000/μl
- Pulmonale Dysfunktion mit PaO₂/FiO₂ < 250 (Harrowitz-Index)
- Arterielle Hypotension ≤ 90 mmHg systolisch
- Renale Dysfunktion (Oligurie mit Urinausscheidung < 0,5 ml/kg/h)
- Metabolische Azidose mit Lactatanstieg > zweifach der oberen Norm

Der septische Schock schließlich beschreibt das Stadium der Sepsis, das mit einem therapierefraktären Kreislaufversagen einhergeht (anhaltender Blutdruckabfall trotz ausreichender Flüssigkeitszufuhr und Notwendigkeit für vasoaktive Medikamente) (ACCP/SCCM Consensus Conference Committee 1992).

Im Jahre 2001 wurde zusammen mit der American Thoracic Society (ATS) und der Surgical Infection Society (SIS) erneut über diese Definitionen und Einteilungen diskutiert. Die Definitionen wurden übernommen und die Symptome der Sepsis weiter ausgeführt. Es wurde zudem über die Entwicklung eines Systems diskutiert, dass in Zukunft die Schweregradeinteilung der Sepsis ermöglicht. Dieses wird als PIRO-Konzept, dass sich aus den Kriterien **P**rädisposition, **I**nfektion, **I**mmunantwort (*Response*) und **O**rgandysfunktion zusammensetzt, bezeichnet (Levy MM et al. 2003).

1.1.3. Pathogenese der Sepsis

Die Pathogenese der Sepsis stellt ein komplexes Wechselspiel zwischen Koagulation, Fibrinolyse, Inflammation und endothelialer Dysfunktion dar. Auslöser einer Sepsis können Mikroorganismen (grampositive oder gramnegative Bakterien, Viren oder Pilze) oder deren toxische Stoffwechselprodukte bzw. Bestandteile sein. Von einem Herd ausgehend, werden die infektiösen Erreger über den Blutkreislauf in den gesamten Organismus geschwemmt. Dort kommen sie in Kontakt mit Zellen des Immunsystems (Dendritische Zellen, Makrophagen, Neutrophile Granulozyten und Natürliche Killerzellen). Diese Zellen werden durch die Anwesenheit von Lipopolysacchariden bzw. Endotoxinen (= Zellwandbestandteile gramnegativer Bakterien) aktiviert und antworten mit der Bildung und Freisetzung von Entzündungsmediatoren (Tumor Nekrosis Faktor- α (TNF- α), Nuclear factor kappa B (NF- κ B), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6)). Diese Zytokine stimulieren das Endothel zur Expression prokoagulatorischer Faktoren (z.B. *Tissue* Faktor) auf der Endothelzelloberfläche, der Hochregulation von Adhäsionsmolekülen, der Produktion chemoaktiver Substanzen und der Bildung vasoaktiver Faktoren. Der prokoagulatorisch wirksame *Tissue* Faktor in Verbindung mit dem Verlust der antikoagulativ wirksamen Oberflächensstruktur aktiviert die Gerinnung. Der *Tissue* Faktor aktiviert den

Gerinnungsfaktor VII und leitet dadurch den extrinsischen Weg der Gerinnungskaskade ein (ten Cate H et al. 1993).

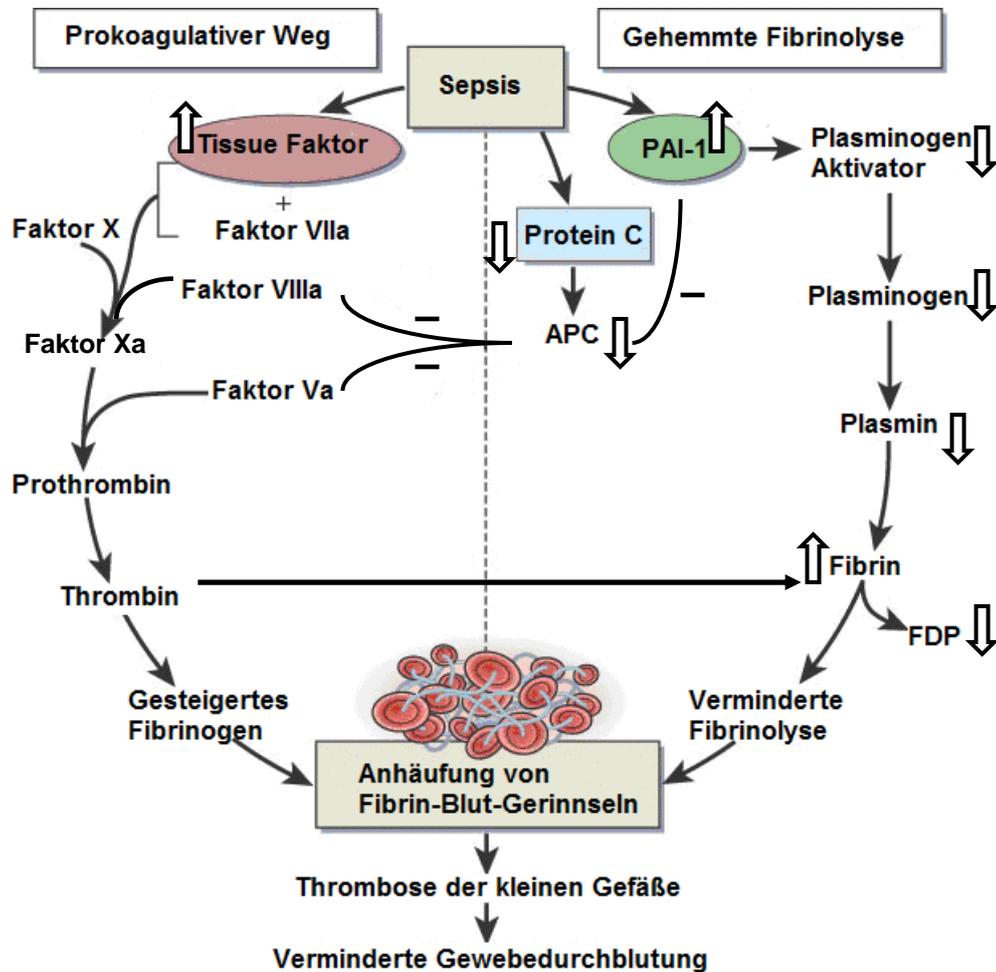


Abbildung 1-1: Septisch induziertes Ungleichgewicht in der Hämostase

Sepsis stört das normale Gleichgewicht zwischen pro- und antikoagulativen Mechanismen und zwischen Koagulation und Fibrinolyse. Die Expression des *Tissue* Faktors bewirkt eine Gerinnungsaktivierung, was zu einem gesteigerten Fibrin-Gehalt führt. Gleichzeitig kommt es zu einem erhöhten Spiegel an PAI-1, das die Fibrinolyse durch Hemmung des *Tissue*-Plasminogen Aktivator (t-PA) blockiert. Ein Verbrauch an Protein C in der Sepsis bedeutet eine zusätzliche Einschränkung des antikoagulativen Wegs. Als Folge entsteht ein verzweigtes Fibringerinnsel in der Mikrogefäßzirkulation mit daraus resultierendem geringen Sauerstoffgehalt des Gewebes und Zelltod bzw. Organdysfunktion. (modifiziert nach: Cohen J 2002)

Am Ende der Kaskade steht die Aktivierung von Thrombin, welches zu einer Steigerung der Fibrinbildung führt. Gleichzeitig induziert Thrombin durch die vermehrte Freisetzung von *tissue*-Plasminogen Aktivator (t-PA) die Fibrinolyse. Während der Sepsis wird jedoch durch die endotheliale Produktion von Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-I) der t-PA neutralisiert, so dass es zu einer Inhibition der Fibrinolyse kommt. Zudem bewirkt Thrombin die Freisetzung von Thrombin-abhängiger Fibrinolyse Inhibitor (TAFI), der ebenfalls die Fibrinolyse reduziert. Dadurch kommt es zu einem Ungleichgewicht von Gerinnung und Fibrinolyse. Dieses wird noch durch einen Verbrauch von natürlichen Antikoagulanzen (Antithrombin, Protein C und dem *Tissue factor pathway inhibitor* (TFPI)) verstärkt (Levi M et al. 2002). Als Folge entstehen Fibrinnetze in den kleinen Blutgefäßen, die eine ausreichende Gewebepfusion verhindern und zu einer Organdysfunktion führen.

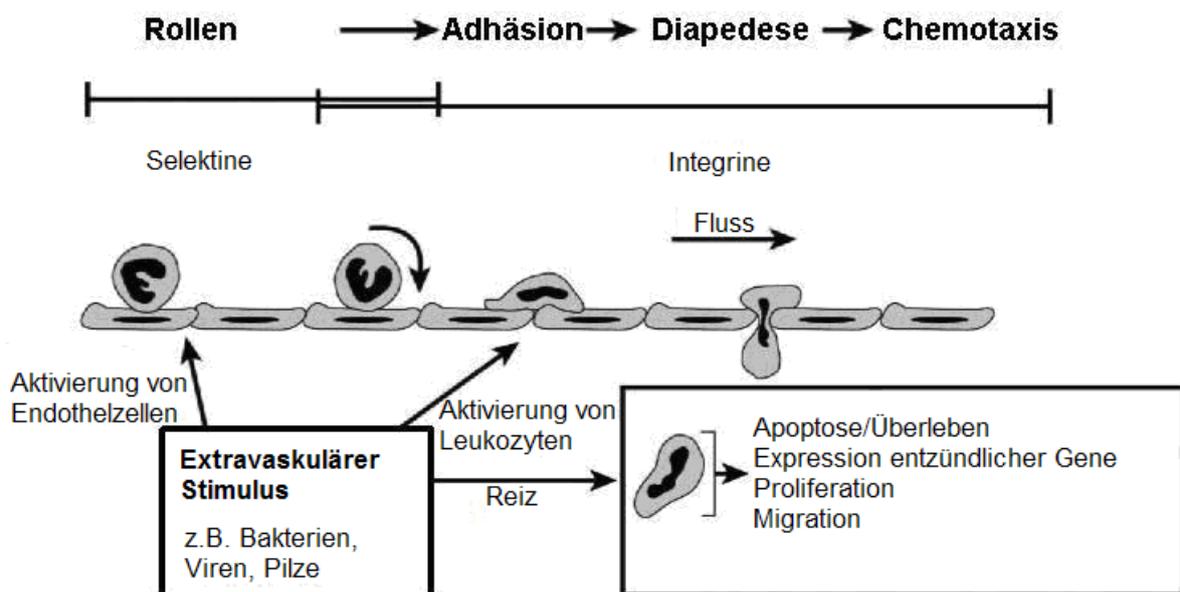


Abbildung 1-2: Rollen, Adhäsion und Diapedese von Leukozyten

Durch extravaskuläre Reize kommt es zu einer Selektin-vermittelten initialen Bindung und zum Rollen der Leukozyten, gefolgt von einer Integrin-Aktivierung, die eine festere Adhäsion der Leukozyten an das Endothel ermöglicht. Mit verschiedenen chemoaktiven Substanzen übermitteln Leukozyten benachbarten Zellen den Reiz zur Apoptose, oder alternativ zum Überleben, zur Proliferation bzw. Migration. (modifiziert nach: Harlan JM et al. 2002)

Die vermehrte endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen (E-Selektin, P-Selektin, Intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und *Vascular cell* Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1)) durch Zytokine führt zum Rollen der Leukozyten über das Endothel mit anschließender Adhärenz und Transmigration in das Gewebe. Die aktivierten Leukozyten setzen ebenfalls proinflammatorische Zytokine frei, die das Entzündungsgeschehen zusätzlich fördern.

1.1.4. Inzidenz der Sepsis

Die Sepsis ist eine häufige Erkrankung mit hoher Letalität. Weltweit gibt es ca. 1,5 Millionen Sepsispatienten pro Jahr. Nach einer aktuellen Studie des Kompetenznetzes Sepsis liegt die Anzahl der Betroffenen in Deutschland bei ca. 150000/Jahr. Jeden Tag sterben hierzulande ca. 162 Menschen an der Sepsis. Damit ist die Sepsis in Deutschland die dritthäufigste Todesursache nach koronarer Herzkrankheit und Tumorerkrankungen. Eine Studie in den USA aus dem Jahr 2001 besagt, dass dort jedes Jahr 751000 Patienten an einer Sepsis erkranken. Von diesen sterben ca. 215000 Patienten. Das sind ca. 9,3 Prozent aller Todesfälle in den USA. Es wurde zudem festgestellt, dass vor allem ältere (> 85 Jahre) und sehr junge (<1 Jahr) Menschen betroffen sind. Nach dieser Untersuchung aus den USA geht eine Sepsis am häufigsten von einer Lungenentzündung (44%), Bakterien im Blut (17,3%), einer Infektion der Harn- und Geschlechtsorgane (9,1%) und Infektionen der Bauchorgane (8,6%) aus (Angus et al. 2001).

1.1.5. Therapie der Sepsis

Die Therapie der Sepsis besteht aus mehreren grundlegenden Maßnahmen: Zum einen muss versucht werden, die auslösenden Infektionsherde zu beseitigen bzw. die Krankheitserreger zu bekämpfen, und zum anderen müssen die Organfunktionen aufrechterhalten bzw. wiederhergestellt werden. In den letzten Jahren gab es zusätzlich neue Entwicklungen in der

Therapie. Hierzu zählt der Einsatz von rekombinant hergestelltem aktivierten Protein C (Bernard GR et al. 2001), die Therapie mit niedrig dosiertem Hydrocortison (Annane D et al. 2002), die intensivierete Insulintherapie (Van den Berghe G et al. 2001) und die Strategie der frühzeitigen, zielgerichteten Schockbehandlung (Rivers E et al. 2001).

Die weltweite, multizentrische, placebo-kontrollierte, randomisierte Phase III Studie (PROWESS-Studie, Protein C Worlwide Evaluation in Severe Sepsis) mit 1690 Patienten mit schwerer Sepsis ergab eine 19,4%-ige Reduktion der relativen Sterblichkeitsrate bzw. eine absolute Reduktion von 6,1% aufgrund der Therapie mit rhAPC (24µg/kg Körpergewicht/h über 96h). Die Inzidenz einer schweren Blutung war in der rhAPC-behandelten Gruppe tendenziell höher als in der Placebogruppe (3,5% versus 2%, p=0,06) (Bernard GR et al. 2001). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde APC vorzeitig zur Behandlung von Patienten mit schwerer Sepsis (d.h. Multiorganversagen oder APACHE II score \geq 25) zugelassen.

1.2. Aktiviertes Protein C

Aktiviertes Protein C (APC) ist eine Serinprotease, die durch die Aktivierung des Vitamin K abhängigen Protein C entsteht (Kisiel W 1979). Durch die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin, einem Oberflächenprotein des Endothels, wird Protein C aktiviert (Esmon CT 1989). APC wird von der Firma Lilly rekombinant hergestellt und ist unter dem Namen Xigris zugelassen (Eli Lilly, Indianapolis). Der generische Name für rekombinantes APC ist Drotrecogin alfa (aktiviert). APC hat zusammen mit Protein S vielfältige Funktionen: Es wirkt antikoagulativ, profibrinolytisch und antiinflammatorisch (Yan SB et al. 1994; Bajzar L 1996; Esmon CT 2000a). Die normale Plasma-Konzentration von Protein C beim Menschen beträgt 4µg/ml, während die Spiegel von APC beim gesunden Menschen bei 2,3ng/ml liegen (Gruber A et al. 1992). Die Halbwertszeit ($t_{1/2\alpha}$) von Protein C beim Menschen beträgt 10 Stunden (Okajima K et al. 1990; Dryfus M et al. 1991; Conrad J. et al. 1993). Hingegen liegt die Halbwertszeit ($t_{1/2\alpha}$) von sowohl im Plasma vorhandenem APC als auch von rekombinant hergestelltem APC (rhAPC), beim Menschen nur bei 20 Minuten (Miletich J et al. 1987; Vervloet MG et al. 1998). Die kurze Halbwertszeit von APC erklärt sich durch Neutralisation bzw. Abbau durch verschiedene Plasmaserin-Proteasen, wie dem Protein C Inhibitor, dem α_1 -Antitrypsin, dem α_2 -Antiplasmin und dem Plasminogen activator inhibitor-1 (Heeb MJ et al. 1989; Marlar AB et al. 1993; Scully MF et al. 1993). Das menschliche Protein C ist dem bovinen Protein C in seiner Peptidsequenz ähnlich. Die therapeutische Dosis von APC in klinischen Studien am Menschen beträgt 24µg/kg/h (Bernard GR et al. 2001). Wenn in Tierexperimenten humanes APC eingesetzt wird, so müssen aufgrund der Speziesunterschiede wesentlich höhere Dosen von ca. 100µg/kg bis 2mg/kg verwendet werden (Mizutani A et al. 2000; Isobe H et al. 2004).

1.2.1. Antikoagulatorische Wirkung von APC

Das Gerinnungssystem stellt ein komplexes Wechselspiel zwischen Koagulation und Fibrinolyse dar. Durch verschiedene pro- und antikoagulatorische Faktoren des Blutes wird die Grundlage für das physiologisch hämostatische Gleichgewicht geschaffen. Ein entscheidender Faktor im Wechselspiel zwischen Koagulation und Fibrinolyse ist das Thrombin. Es stimuliert die Koagulation durch die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin und aktiviert zugleich Thrombozyten. Andererseits induziert Thrombin auch antikoagulatorische Effekte, indem es sich an Thrombomodulin, das in der Zellmembran des Endothels eingelagert ist, bindet. Der Thrombin-Thrombomodulin-Komplex wandelt Protein C in seine aktive Form um (Esmon CT 1989). Damit wird der antikoagulative Weg eingeleitet. APC hemmt die Koagulationskaskade durch die proteolytische Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa (Rigby AC et al. 2004). Hierdurch erfolgt eine indirekte Hemmung der Thrombinbildung durch Inhibierung des Faktor Va abhängigen Prothrombinase-Komplexes und des von Faktor VIIIa abhängigen Tenase-Komplexes. Durch diesen Rückkopplungsmechanismus des Thrombins wird eine überschüssige Gerinnungsaktivierung verhindert und ein Gleichgewicht der Hämostase gewährleistet. Das aktivierte Protein C ist dabei ein wesentlicher Bestandteil des antikoagulativen Systems.

Die antikoagulative Wirkung des APC ist besonders in der Mikrozirkulation zu beobachten. Der Grund hierfür liegt in dem Verhältnis aus Endothelzellen zum Blutvolumen. Dieses ist in der Mikrozirkulation wesentlich höher und damit einhergehend erhöht sich auch die Konzentration an Thrombomodulin und damit die Synthesemöglichkeit für APC (Esmon CT 1989).

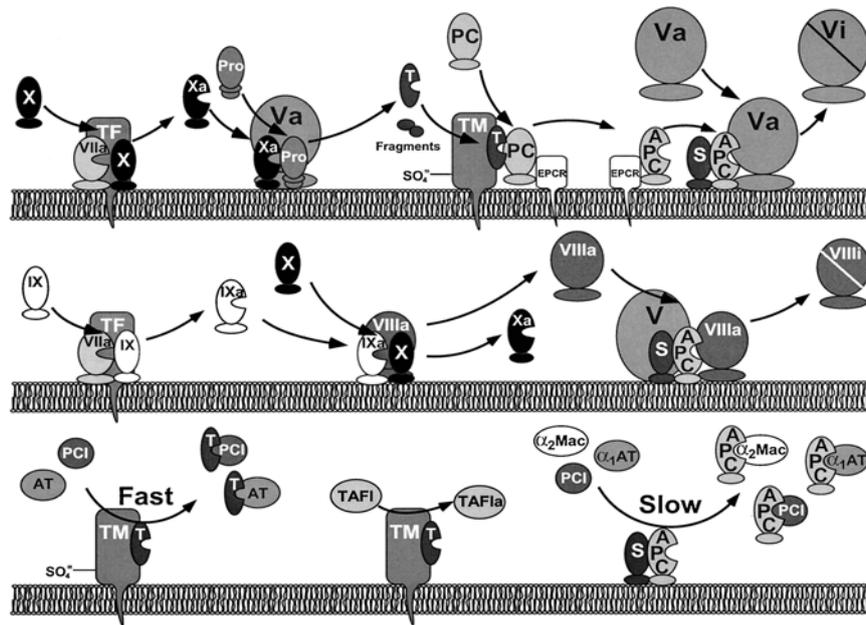


Abbildung 1-3: Wechselwirkung des Protein C-Wegs mit der extrinsischen Koagulationskaskade

Tissue Faktor (TF) bindet den Faktor VIIa (a=aktiv) um die Faktoren IXi (i=inaktiv) und Xi (i=inaktiv) zu aktivieren. Die Faktoren IXa und Xa gehen einen Komplex mit dem Faktor VIIIa oder Va ein. Die Aktivierung dieser Gerinnungskaskade wird durch den Komplex aus APC und Protein S (S) inaktiviert. APC, das durch Thrombin (T), Thrombomodulin (TM) und den endothelialen Protein C-Rezeptor (EPCR) aktiviert wird, kann durch den Protein C Inhibitor (PCI), das α_1 -Antitrypsin (α_1 -AT), das α_2 -Antiplasmin (α_2 -MAC) und den Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) antagonisiert werden. Gleichzeitig bewirkt der Komplex aus Thrombomodulin und Thrombin eine Aktivierung des Thrombin-abhängigen Fibrinolyse Inhibitors (TAFI), der die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin und damit die Fibrinolyse inhibiert. Thrombin kann durch Antithrombin (AT) oder Protein C Inhibitor (PCI) gehemmt werden (modifiziert nach: Esmon CT 2000b).

Durch verschiedene Faktoren kann dieses sensitive System gestört werden. Dazu gehören sowohl angeborene als auch erworbene Störungen, die zu einer überschüssigen Koagulation und der damit verbundenen Gefahr thromboembolischer Komplikationen führen. Die bekannteste und häufigste angeborene Störung ist eine Punktmutation des Faktor V-Gens (Faktor V Leiden Mutation). Diese Mutation führt zu einer Resistenz des Faktors V gegenüber APC und damit zur Hemmung des antikoagulatorischen Systems. Ebenso führen homozygote Protein C-Defekte bei Kindern zu lebensbedrohlichen Thrombosekomplikationen, und bei der heterozygoten Form ist eine erhöhte Inzidenz an venösen Thromben festzustellen (Seligsohn U et al. 1984; Bovill EG et al. 1989). Daneben gibt es noch weitere *erbliche* Defekte von Protein C, Thrombomodulin und Antithrombin, die zu einer Störung des Protein C Systems führen (Dahlbäck B et al. 1996; Murin S et al. 1998; Roborty RS et al. 2001). Zu den *erworbenen* Defekten gehören verschiedenste Erkrankungen der Leber, die das Hauptorgan für die Protein C Synthese darstellt (Beckmann RJ et al. 1985; He XF et al. 2004). Auch die schwere Sepsis kann eine Ursache für die Entstehung eines *erworbenen* Mangels an Protein C sein. Als Ursache hierfür werden ein gesteigerter Verbrauch von Protein C durch Umwandlung in seine aktivierte Form, ein vermehrter Verbrauch von APC und eine verminderte Synthese von Protein C in der Leber diskutiert (Dhainaut et al. 2001). Hinzu kommt die Aktivierung inflammatorischer Zytokine (TNF- α und IL), die die Produktion an Thrombomodulin herunterregulieren. Dadurch kann Protein C schlechter aktiviert werden (Nawroth PP et al. 1986; Moore KL et al. 1989; Faust SN et al. 2001).

Zusammenfassend kann damit von einer Störung des Protein C Systems bei Patienten mit schwerer Sepsis ausgegangen werden, die sich entweder in einem Mangel an Protein C oder einer verminderten Umwandlung in seine aktivierte Form manifestiert. Die Folge ist ein Überwiegen prokoagulatorischer Effekte und ein erhöhtes Risiko für die Entstehung einer disseminierten intravasalen Gerinnung mit der Ablagerung von Fibrin und der Störung der Mikrozirkulation in den verschiedenen Organsystemen. Diese Veränderungen werden als Ursache des Multiorganversagens bei schwerer Sepsis angesehen. Untersuchungen konnten zeigen, dass Patienten, die an einer Sepsis leiden und niedrige Plasmakonzentrationen an Protein C aufweisen, ein erhöhtes Sterblichkeitsrisiko haben (Fourrier F et al. 1992; Powars D et al. 1993; Lorente JA et al. 1993; Boldt J et al. 2000). Folgerichtig erscheint die Normalisierung der Plasmakonzentration von aktiviertem Protein C eine Wiederherstellung

der Balance pro- und antikoagulatorischer Effekte des Gerinnungssystems zu versprechen. Neben diesen direkten Effekten des Protein C-Systems auf die Blutgerinnung scheinen jedoch auch profibrinolytische und anti-inflammatorische Eigenschaften von aktiviertem Protein C für den am Menschen gezeigten Überlebensvorteil von Bedeutung zu sein (Bernard G et al. 2001).

1.2.2. Profibrinolytische Wirkung von APC

Das Gleichgewicht der Blutgerinnung wird nicht nur durch ein Wechselspiel pro- und antikoagulativer Faktoren sondern auch durch Interaktion zwischen pro- und antifibrinolytischen Mediatoren gewährleistet. Thrombin kommt auch hier eine entscheidene Rolle zu. Zum einen aktiviert Thrombin das TAFI, eine Plasma-Procarboxypeptidase B, die die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin hemmt (Bajzar L et al. 1995). Plasmin ist das zentrale Enzym der Fibrinolyse, das durch den *tissue*-Plasminogen Aktivator (t-PA) aus Plasminogen aktiviert wird. Zudem fördert Thrombin die Freisetzung von PAI-1, das wiederum einen Komplex mit dem t-PA eingeht und diesen somit an der Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin hindert. Diese beiden Wirkmechanismen des Thrombins, nämlich die Aktivierung von TAFI und PAI-1, bewirken eine Hemmung der Fibrinolyse.

Um ein Gleichgewicht in der Blutgerinnung zu bewahren, kann Thrombin auch Fibrinolyse initiieren. Dieses geschieht durch die Aktivierung von Protein C durch eine Komplexbildung mit dem Thrombomodulin. APC steigert die Fibrinolyse durch eine Neutralisation des PAI-1, indem APC eine Bindung mit PAI-1 eingeht und somit t-PA vor dessen Inaktivierung schützt (Vervloet M et al. 1998).

Zudem bewirkt APC durch seinen antikoagulativen Effekt, dass insgesamt weniger Thrombin und als Folge dessen auch weniger PAI-1 und TAFI gebildet werden (Bajzar L et al. 2004). Es wurde auch gezeigt, dass APC die t-PA-induzierte Lyse des Fibrinnetzes direkt beschleunigt (Hesselvik J et al. 1991).

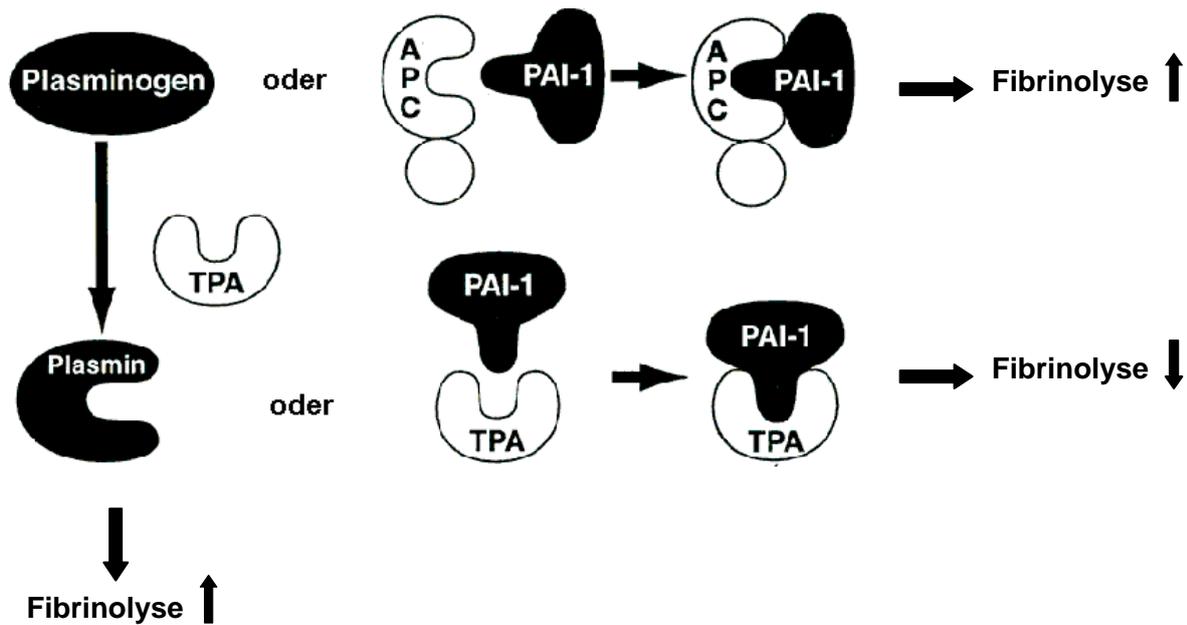


Abbildung 1-4: Die Rolle des APC in der Regulation der Fibrinolyse

Tissue-Plasminogen Aktivator (t-PA) wandelt Plasminogen zu Plasmin um, das die Fibrinolyse steigert (links). PAI-1, das vermehrt in der Sepsis synthetisiert wird, inaktiviert TPA, so dass der Grad der Fibrinolyse erniedrigt ist (rechts unten). APC kann auch Komplexe mit den PAI-1 eingehen und fängt damit den PAI-1 vor der Bindung mit t-PA ab (rechts oben). Hieraus resultiert eine gesteigerte Fibrinolyse (modifiziert nach: Esmon CT 2001).

1.2.3. Indirekte und direkte antiinflammatorische Wirkung von APC

Neben den bisher genannten Wirkungen werden dem APC auch antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben:

Wie bereits erwähnt, hemmt APC die Thrombinbildung über eine Hemmung der Gerinnungskaskade. Hierdurch werden indirekt auch die von Thrombin hervorgerufenen proinflammatorischen Effekte vermindert. Zu den proinflammatorischen Aktivitäten des Thrombins zählen unter anderem die Aktivierung von Thrombozyten und Endothelzellen. Diese induzieren wiederum mittels Chemokinfreisetzung die Chemotaxis von Monozyten und Neutrophilen und steigern die Expression von Leukozytenadhäsionsmolekülen (Bizios R et al.

1986; Drake WT et al. 1992). Zusätzlich kommt es zu einer erhöhten endothelialen Expression von Platelet activated factor (PAF), der neutrophile Granulozyten aktiviert (Esmon CT 2000b). APC verhindert diese endotheliale Aktivierung, indem es die Thrombinbildung hemmt, und agiert somit *indirekt* als antiinflammatorischer Faktor.

APC besitzt aber auch eine *direkte* antiinflammatorische Wirkung, die sehr wahrscheinlich unabhängig von seiner antikoagulativen Eigenschaft zustande kommt. *In vitro* verhindert es direkt die Inflammation durch eine Hemmung der Lipopolysaccharid- oder Interferon- γ -induzierten, monozytären Produktion der proinflammatorischen Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor- α - (TNF- α), Macrophage Inflammatory Protein-1 α (MIP-1 α)- und Macrophage Migration Inhibitory Factor-1 (MIF-1) (Grey ST et al. 1994; Schmidt-Supprian M et al. 2000; Brückmann M et al. 2004). Die durch Endotoxin-Stimulation vermehrte Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und Aktivator Protein-1 (AP-1) in Monozyten wird durch APC direkt gehemmt (Yuksel M et al. 2002). Mit Hilfe von APC nimmt die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM, E-Selektin) ab (Joyce DE et al. 2001). Dadurch wird auch die E-Selektin vermittelte Leukozyten-Adhäsion am Endothel gehemmt (Grinnell BW et al. 1994; Murakami K et al. 1996; Murakami K et al. 1997). Zusätzlich werden weitere Zytokin-vermittelte Effekte in Endothelzellen und Monozyten durch APC vermindert (Taylor FB Jr et al. 1987; Grey ST et al. 1994; Murakami K et al. 1997; White B et al. 2000; Yuksel M et al. 2002).

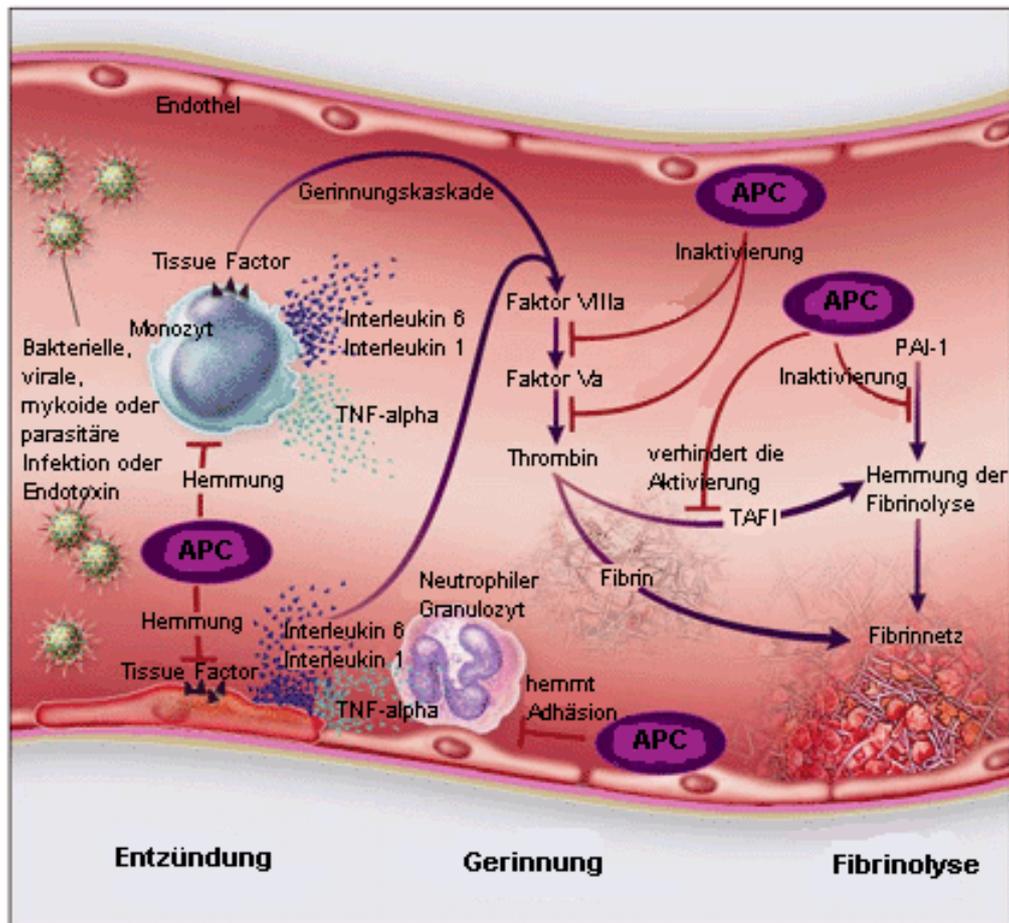


Abbildung 1-5: Mögliche Angriffspunkte von aktiviertem Protein C bei der Modulation von Inflammation, Koagulation und Fibrinolyse (modifiziert nach: Bernard GR et al. 2001)

1.2.4. Antiapoptotische Wirkmechanismen von APC

In Endothelzellen zeigt rhAPC eine antiapoptotische Wirkung (Joyce DE et al. 2001). Es supprimiert die proapoptotisch-assoziierten Gene Calreticulin und TRMP-2 und fördert die Expression antiapoptotisch wirkender Gene (Bcl-2 und Inhibitor of Apoptosis (IAP)) (Joyce DE et al. 2001). In einem ischämiegeschädigten zerebralen Gefäßsystem inhibiert APC die p53-induzierten Apoptose mikrovaskulärer Endothelzellen (Cheng T et al. 2003).

1.2.5. Rezeptoren von APC

Der endotheliale Protein C-Rezeptor (EPCR), der überwiegend von Endothelzellen der großen Blutgefäße exprimiert wird, aber auch auf Monozyten und neutrophilen Granulozyten zu finden ist, gehört zu den Typ1 der Transmembranären Proteine (Fukudome K et al. 1994; Fukudome K et al. 1996; Laszik Z et al. 1997).

Der EPCR ist mitbeteiligt an der Aktivierung von Protein C zu APC: Protein C bindet an den EPCR und wird so dem Thrombin-Thrombomodulin-Komplex präsentiert. Dem EPCR scheint zudem eine protektive Rolle bei der antiinflammatorischen Wirkung des APC zuzukommen. Eine tierexperimentelle Untersuchung an Affen zeigte, dass durch Blockade des EPCR mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers die Letalitätsrate nach subletaler E. coli-Infusion gesteigert wurde und zugleich der Serumspiegel von proinflammatorischen Zytokinen (Interleukin-6 und Interleukin-8) signifikant anstieg (Taylor FB Jr et al. 2000).

Ein weiterer wichtiger Rezeptor für die Signaltransduktion von APC ist der G-proteingekoppelte proteaseaktivierbare Rezeptor-1 (PAR-1). APC induziert die Expression protektiver Gene in Endothelzellen mittels PAR-1 in Abhängigkeit von der Bindung an EPCR (Riewald M et al. 2002). Dabei ist bisher nicht bekannt, wie APC antiinflammatorische Effekte über den PAR-1 steuert, während Thrombin über den gleichen Rezeptor proinflammatorische Wirkungen hervorruft.

Seit kurzem wird eine EPCR-PAR-1-Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-abhängige (S1P₁)-Co-Stimulation zur Förderung der Endothelzell-Integrität diskutiert: Es wird vermutet, dass APC über die Aktivierung von EPCR und PAR-1 die Sphingosin-Kinase-1 (SK1)-Aktivität steigert und dadurch vermehrt Sphingosin-1-Phosphat (S1P) gebildet wird. Dieses ruft durch eine Bindung an den Sphingosin-1-Phosphat-1-Rezeptor (S1P₁) protektive Effekte am Endothel hervor (Feistritz C et al. 2005; Finigan H et al. 2005).

1.2.6. APC in der Behandlung der Sepsis

Die meisten Sepsispatienten haben einen erniedrigten Plasma-Protein C-Gehalt, der mit einer gesteigerten Sterblichkeitsrate einhergeht (Fourrier F et al. 1992; Lorente JA et al. 1993; Powars D et al. 1993; Boldt J et al. 2000). Die Umwandlung von Protein C zu APC ist bei Patienten mit Sepsis wahrscheinlich durch Herunterregulierung von Thrombomodulin infolge des Einflusses inflammatorischer Zytokine gestört (Boehme MW et al. 1996). Daraus und aus den bekannten antiinflammatorischen Effekten von APC könnte geschlossen werden, dass die Gabe von APC bei Sepsis die Sterblichkeitsrate senken kann. Die Applikation von APC in einem Affen-Modell einer lethalen E. coli-Sepsis zeigte eine protektive Wirkung (Taylor FB Jr et al. 1987). Auch in einer humanen placebo-kontrollierten Phase II Studie senkte die Gabe von rhAPC bei Patienten mit schwerer Sepsis den Plasmaspiegel von D-Dimer und IL-6 sowie von anderen Markern der Koagulation und Inflammation (Hartmann DL et al. 1998). Die weltweite, multizentrische placebo-kontrollierte Phase III Studie (PROWESS-Studie, Protein C Worlwide Evaluation in Severe Sepsis) an 1690 Patienten mit schwerer Sepsis ergab eine 19,4%-ige Reduktion der relativen Sterblichkeitsrate und eine absolute Reduktion von 6,1% aufgrund der Therapie mit rhAPC (24µg/kg Körpergewicht/h über 96h). Die Inzidenz einer schweren Blutung war in der rhAPC-behandelten Gruppe tendenziell höher als in der Placebogruppe (3,5% versus 2%, p = 0,06) (Bernard GR et al. 2001).

1.3. Fractalkine

Fractalkine (auch CX3CL1 genannt) ist ein aus 373 Aminosäuren bestehendes Chemokin (Abb. 1-6), das sich in seiner Struktur von anderen Chemokinen unterscheidet (Bazan JF et al. 1997, Pan et al. 1997). Chemokine werden anhand der Anzahl und der Platzierung der ersten zwei Cysteine (C) in vier Subfamilien unterteilt: C, CC, CXC und CX3C (X = andere Aminosäuren) (Zlotnik A et al. 2000). Fractalkine ist das erste und einzige Chemokin der Subfamilie CX3C. Es wird als transmembranäres Molekül auf der Zelloberfläche exprimiert und gliedert sich in einen extrazellulären, transmembranären und intrazellulären Anteil. Der extrazelluläre Bereich enthält mit 76 Aminosäuren den Chemokinanteil, gefolgt von einem erweiterten Mucin-ähnlichem Stängel. Daran schließt sich der transmembranäre Bereich und der intrazelluläre Anteil, der aus 37 Aminosäuren besteht, an (Umehara H et al. 2001). Fractalkine-mRNA ist in den meisten menschlichen Organen, einschließlich Herz, Gehirn, Lunge, Niere, Intestinum und Skelettmuskulatur, vorzufinden (Bazan JF et al. 1997). Die Expression von Fractalkine wird in Gegenwart der Entzündungsmediatoren Tumor-necrosis factor (TNF) α , Interleukin-1 (IL-1), Interferon- γ (IFN- γ) und Lipopolysacchride (LPS) in einer Nuclear factor kappa B-abhängigen Art und Weise hochreguliert (Garcia GE et al. 2000). Die membranäre Form kann proteolytisch durch das TNF- α -converting Enzym (TACE [ADAM17]) und A Disintegrin and Metalloproteinase Domain 10 (ADAM10) zu einer löslichen Form abgespalten werden (Garton KJ et al. 2001). Während die zellständige Form ebenso wie die klassischen Adhäsionsmoleküle E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 als potentes Adhäsionsmolekül dient, ist die lösliche Form wie kein anderes Adhäsionsmolekül zusätzlich chemotaktisch wirksam auf T-Lymphozyten, Monozyten und polymorphkernige neutrophile Granulozyten, die den Rezeptor für Fractalkine (CX3CR1) exprimieren. CX3CR1 ist ein 7-strängiger transmembranärer Rezeptor, der intrazellulär an ein GTP-gebundenes Protein koppelt. Der Fractalkine-Rezeptor wird beim Menschen auf der Oberfläche von CD16⁺ natürlichen Killerzellen (NK) und CD14⁺ Monozyten und einigen T-Zell-Subpopulationen exprimiert (Imai T et al. 1997).

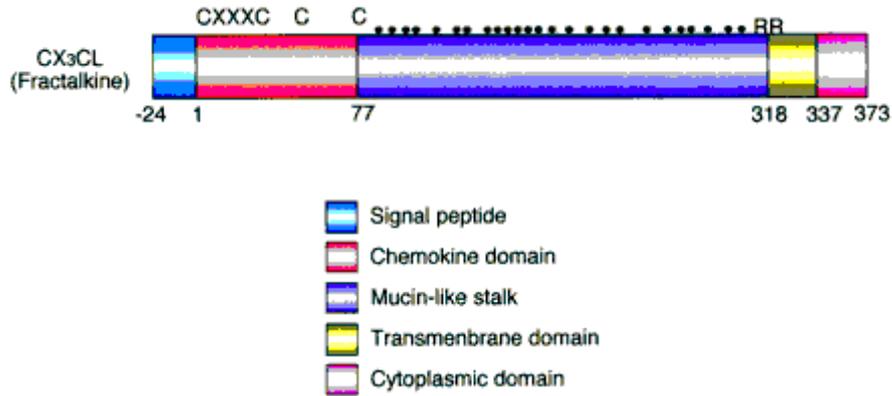


Abbildung 1-6: Schematische Struktur von Fractalkine

Fractalkine ist aus 373 Aminosäuren aufgebaut. Es beginnt mit einem vorgeschalteten Signalpeptid (1-76), welches drei Einschübe von Aminosäuren (XXX) zwischen den beiden ersten Cysteinen enthält. Es folgt ein Mucin-ähnlicher Teil mit gehäuften Threoninen (•) (77-317) und darauffolgendem transmembranären Bereich (318-336). Am Ende kommt der intrazelluläre Anteil (337-373). RR bezeichnet ein membranproximales Motiv, das zwei einsetzbare Hydrogenstellen besitzt (modifiziert nach: Umehara H et al. 2003).

In seiner dualen Funktion als Adhäsionsmolekül und Chemokin ist Fractalkine ein wichtiger Stimulus für die Leukozytenrekrutierung und Immunabwehr am Ort der Infektion. Fractalkine beeinflusst die Rollen von Leukozyten am Endothel, die Adhäsion an das Endothel und die Transmigration ins Gewebe. Es dient somit der Eindämmung lokaler pathogener Erreger (Umehara H et al. 2001) (Abb. 1-7).

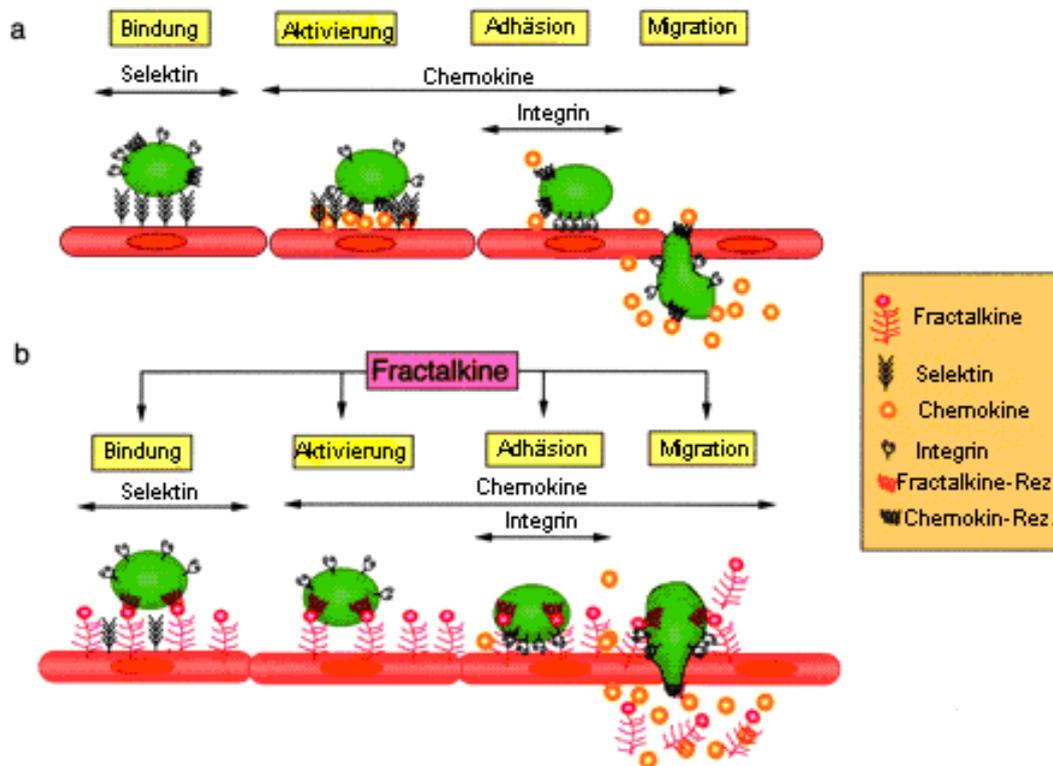


Abbildung 1-7: Schematisches Modell des klassischen und Fractalkine-induzierten Wegs in der Adhäsionskaskade der Leukozyten.

a) Klassischer Weg und b) Fractalkine-induzierter Weg: Fractalkine wird auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert und bindet ähnlich wie Selektin die Leukozyten in einer Selektin- und Integrin-unabhängigen Weise. Fractalkine unterstützt die Leukozytenmigration (modifiziert nach: Umehara H et al. 2003).

Es wurde gezeigt, dass Fractalkine bei verschiedensten Erkrankungen involviert ist: Hierzu gehören die Arteriosklerose (Greaves DR et al. 2001; Combadiere C et al. 2003), kardiovaskuläre Erkrankungen (Umehara H et al. 2001, Alexander WR 2001, Cybulsky MI et al. 2003), Transplantatabstoßungen (Robinson LA et al. 2000), HIV-Infektion (Tong N et al. 2000, Faure S et al. 2000; Faussat A et al. 2001), Glomerulonephritis (Feng L et al. 1999; Furuichi K et al. 2001), rheumatoide Arthritis (Vollin MV et al. 2001; Nanki T et al. 2002), Psoriasis (Raychaudhuri SP et al. 2001), verschiedene entzündliche Erkrankungen der Niere und des Gehirns (Fujimoto K et al. 2001; Cockwell P et al. 2002), sowie allergische entzündliche Atemwegserkrankungen (Rimaniol A et al. 2003).

1.4. Transforming Growth Factor- β 2

Transforming growth factor (TGF)- β gehört zu der Gruppe der Zytokine. Es hat vielfältige Funktionen und ist unter anderem in der Regulation der Proliferation, Differenzierung, Migration und Erhaltung verschiedener Zellsysteme involviert (Roberts AB et al. 1993). In der TGF- β -Familie wurden bisher fünf Isoformen TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 und TGF- β 5 identifiziert, die in ihrer Struktur eine hohe Homologie (60-80%) aufweisen. Die ersten drei genannten Isoformen sind nur im Gewebe von Säugetieren vorzufinden und werden dort von vielen verschiedenen Zellen produziert. Die beiden Isoformen TGF- β 4 und TGF- β 5 werden vor allem im Huhn und Frosch vorgefunden.

TGF- β 2, so wie auch TGF- β 1 und TGF- β 3, werden in einer inaktiven Form freigesetzt. Um die verschiedenen Funktionen ausüben zu können, muss TGF- β 2 durch eine proteolytische Abspaltung von LAP (Latentes Assoziationsprotein) und LTBP (Latentes TGF- β Bindungsprotein) aktiviert werden (Marek A et al. 2002) (Abb. 1-8). Für die Aktivierung von TGF- β 2 sind unter anderem Gewebe-Transglutaminase, Thrombin und Plasmin zuständig (Kojima S et al. 1993; Nunes I et al. 1997). Die aktive Form kann durch Bindung an einen der drei TGF- β Rezeptoren einen Impuls über ein spezifisches SMAD-Protein System an den Zellkern weitergeben (Heldin CH et al. 1997). Im Gegensatz zur inaktiven Form, die ca. 90 Minuten im Blut präsent ist, wird die aktive Form schon nach wenigen Minuten durch Bindung an α ₂-Makroglobulin im Blutkreislauf (Philip A et al. 1991, Lamarre J et al. 1991) oder durch Dekorin in der extrazellulären Matrix (Ketteler M et al. 1994) inaktiviert.

Aus der Summe der komplexen Wirkmechanismen von TGF- β können zwei Hauptaktivitäten unterschieden werden: Zum einen wirkt TGF- β auf lokale Traumata und Gewebedefekte durch Stimulation der Chemotaxis von Granulozyten und Makrophagen und durch Aktivierung von Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF- α proinflammatorisch (Marek A et al. 2002). Er wird in Zusammenhang mit der Regeneration erkrankter Gewebe und Organe, der Remodellierung von Knochen, aber auch bei Neoplasien und Fibrosen im Zuge chronischer inflammatorischer Erkrankungen gesehen (Graham MF et al. 1990; Robak T 1995, Flisiak R et al. 2000). Er fördert die Angiogenese und Chondrogenese, sowie die Aktivierung von Chondroblasten. Hierdurch wird die Produktion extrazellulärer Matrix, besonders Fibronectin, Kollagen und Proteoglykane, stimuliert. Bei Schädigungen der

Intestinummukosa fördert TGF- β die Heilung (Graham MF et al. 1990, Dignass AU et al. 1993; Robak T 1995, Flisiak R et al. 2000).

Der zweite Wirkungskreis des TGF- β umfasst seine systemischen immunmodulatorischen Effekte: Es wirkt vor allem immunsuppressiv, indem es die Produktion von IgG und IgM supprimiert und die IgA-Produktion der B-Lymphozyten steigert (Kehrl JH et al. 1986). *In vitro* Experimente haben gezeigt, dass TGF- β einen Einfluss auf die Interleukin-12 (IL-12) Produktion der Makrophagen besitzt, so dass die zelluläre Immunantwort herunterreguliert wird (Takeuchi M et al. 1998). Mit Hilfe von natürlichen Killerzellen (NK) steigert TGF- β den immunsuppressiven Effekt von CD8-Effektor-Zellen (Yamagiva S et al. 2001).

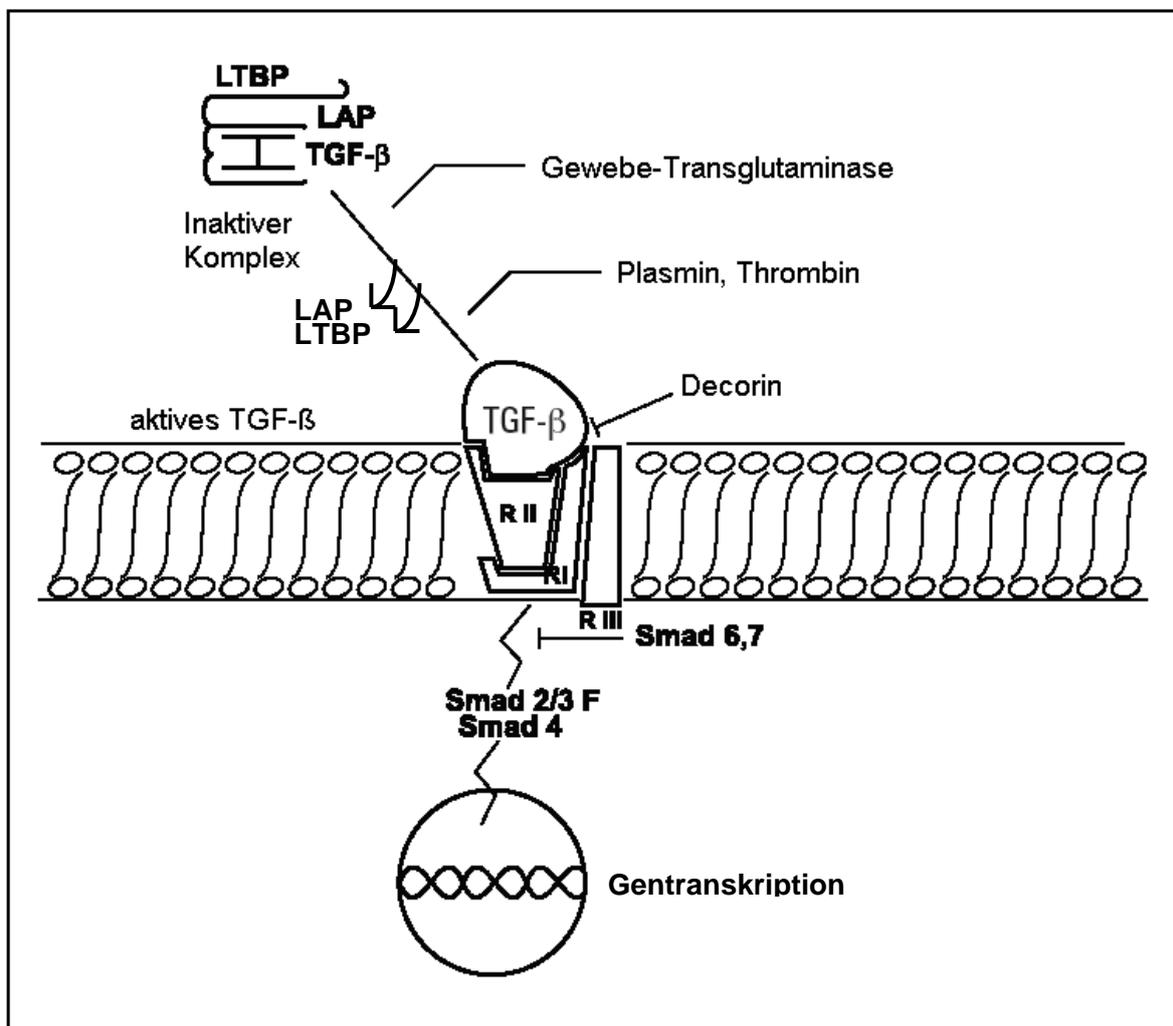


Abbildung 1-8: Aufbau, Aktivierung und Rezeptorbindung von TGF- β
(modifiziert nach: Marek A et al. 2002)

1.5. Cyclooxygenase-2 und Prostaglandin

Die Cyclooxygenase, auch Prostaglandin-H-Synthase genannt, ist ein Enzym, das Arachidonsäure in Prostaglandin H_2 überführt. Prostaglandin H_2 ist die gemeinsame Vorstufe der Prostanoiden. Unter diesem Begriff werden Prostacyclin (PGI_2), Thromboxan A_2 (TXA_2) und die verschiedenen Prostaglandine (D, E, F) zusammengefasst. Die wichtigsten Prostaglandine sind Prostaglandin E_2 (PGE_2) und Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$).

Von der Cyclooxygenase gibt es mindestens zwei Isoformen: Die COX-1 und die COX-2 sind membrangebundene Proteine mit identischer Länge. Ihre Aminosäuresequenz ist zu 62% homolog.

Die Cyclooxygenase-1 ist in vielen Zellarten konstitutiv vorhanden. Sie ist kontinuierlich aktiv und ihre Syntheseprodukte (hauptsächlich PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$) vermitteln vor allem physiologische Vorgänge wie Magenschleimhautprotektion, Hämostase, Förderung der Nierendurchblutung und Tonisierung des Uterus. In den Blutplättchen entsteht Thromboxan A_2 . Seine Hauptwirkung besteht in einer Förderung der Thrombozytenaggregation und der Vasokonstriktion.

Die Cyclooxygenase-2 wird hauptsächlich in Zellen exprimiert, die am Entzündungsgeschehen beteiligt sind; dazu gehören Monozyten, Makrophagen, Leukozyten und Endothelzellen. COX-2 wird durch den Einfluss von LPS und IL-1 von den Makrophagen vermehrt synthetisiert (Lee SH et al. 1992; O'Sullivan MG et al. 1992; Reddy ST et al. 1994). Die Promoter-DNA von COX-2 enthält Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren, unter anderem für Nuclear factor kappa B (NF- κ B) (Hinze B et al. 2002). Diese Transkriptionsfaktoren werden von Zytokinen (TNF- α , IL-1), Lipopolysacchariden, Wachstumsfaktoren und Thrombin (Houliston RA et al. 2002) aktiviert. Somit kann die Expression der COX-2 von diesen Mediatoren induziert werden. Das spezifische Gewicht der COX-2 beträgt 72 kDa.

Neueren Studien zufolge vermittelt COX-2 eine Vielzahl physiologischer Prozesse: So scheint die Cyclooxygenase-2 am Heilungsprozess von gastrointestinalen Ulzera beteiligt zu sein. Es wurde gezeigt, dass COX-2 im Gewebe des Ulkusrandes vermehrt exprimiert wird und die mit der Heilung assoziierte Angiogenese beeinflusst (Mizuno H et al. 1997).

Zusätzlich konnte im Tierexperiment nachgewiesen werden, dass selektive COX-2-Inhibitoren den Heilungsprozess von Magen-Darm-Ulzera verzögern (Schmassmann A et al. 1998). Desweiteren verringerten selektive COX-2-Inhibitoren bei gesunden Probanden die renale Produktion von Prostazyklin. Dies äußerte sich in einer Natrium-Retention (Catella-Lawson F et al. 1999, McAdam BF et al. 1999). Dementsprechend zeigte sich in klinischen Studien, dass selektive COX-2-Inhibitoren bei hypertensiven Patienten den Bluthochdruck verstärken und zu peripheren Ödemen führen können, indem sie die renale Wasser- und Salzausscheidung inhibieren (Catella-Lawson F et al. 1999, Whelton A et al. 2000, Brater DC et al. 2001). Über eine verringerte Prostazyklinproduktion erklärt sich möglicherweise das bei COX-2-Inhibitoren beobachtete erhöhte kardiovaskuläre Risiko.

Über Prostazyklin vermittelt die im Gefäßendothel lokalisierte COX-2 vasoprotektive sowie antiatherogene Effekte. Unter anderem hemmt Prostazyklin die Thrombozytenaggregation (Cheng Y et al. 2002) sowie die Aktivierung und Adhäsion von Leukozyten (Jones G et al. 1984) und vermittelt so protektive Effekte auf das Endothel. Verschiedene Versuche an Tieren zeigen, dass Prostazyklin die intestinale Durchblutung in der Sepsis verbessert (Rasmussen I et al. 1992, Manasia A et al. 1997, Möller AD et al. 2001). So steigerte PGI₂ bei einer Untersuchung an Katzen die intestinale Sauerstoff-Aufnahme und normalisierte sowohl den Laktat- und Pyruvat- als auch den pH-Wert der Darmmukosa (Manasia A et al. 1997). Bei Studien an Schweinen verbesserte Iloprost (ein stabiles Prostazyklin-Analogon) die Durchblutung (Möller AD et al. 2001) sowie die metabolische Aktivität und die Energiebilanz (Träger K et al. 2000) der Leber. Andere Versuche an Tieren mit akuter Sepsis weisen auf zytoprotektive Eigenschaften des Prostazyklins hin. Diese betreffen vor allem die Lunge, die Niere und die Leber (Harbrecht BG et al. 1994, Scheeren T et al. 1997). Außerdem wurde im Tierexperiment nachgewiesen, dass niedrig dosiertes Prostazyklin die durch TNF- α induzierte gesteigerte Gefäßpermeabilität hemmt (Möller AD et al. 1997) und so die Flüssigkeitsansammlung im Gewebe während der akuten Sepsis zu begrenzen scheint.

In einer Publikation von Houliston et al. 2002 wird die COX-2-Expression durch PAR-1-selektive Peptide und Thrombin in HUVEC stimuliert. Wie APC in Bezug auf COX-2 und COX-1 wirkt, ist bislang noch nicht bekannt.

1.6. Fragestellung der wissenschaftlichen Arbeit

Bisher sind die Mechanismen, über die APC immunmodulatorisch wirkt, nicht vollständig aufgeklärt. Gegenstand der hier beschriebenen *in vitro* Untersuchungen zu APC ist die Untersuchung der molekularen Grundlagen der antiinflammatorischen, zellprotektiven, zellregenerativen und antiapoptotischen Wirkungen von APC.

Mit einem Genscreening-Experiment sollte zunächst nach Chemokinen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren gesucht werden, die durch eine APC-Behandlung in humanen Endothelzellen in ihrer Expression gesteigert oder gehemmt werden. Hierbei konnten signifikante Steigerungen der Genexpression von Fraktalkine, TGF- β 2 und von COX-2 festgestellt werden. Mit anschliessend durchgeführten Untersuchungen auf m-RNA- und Proteinebene (z.B. mittels Enzym-linked immunosorbent assay (Elisa), Western-Blot und reverse-Transkriptase Kettenreaktion (rtPCR)), sollten diese Ergebnisse bestätigt werden.

Neben der Modulation der endothelialen Expression von Fractalkine, TGF- β 2 und COX-2 durch die Behandlung mit APC wurde außerdem die Beteiligung der Rezeptoren (EPCR, PAR-1, PAR-2), der Einfluss von Rezeptor-Antagonisten und die Wirkung von Protein C auf diese Mediatoren untersucht.

Bei der Untersuchung von COX-2 wurde das Hauptaugenmerk auf das Syntheseprodukt Prostazyklin gerichtet. Prostazyklin scheint günstige Effekte in der Sepsis zu besitzen und ist deswegen von besonderem Interesse in der Erforschung der APC-Wirkmechanismen.

Die gewonnenen Ergebnisse könnten zu einem besseren Verständnis der *in vitro* Wirkmechanismen von APC führen. Dies könnte auch *in vivo* bedeutsam sein für die Dosierung, Applikationsweise und Indikationsgebiete von APC bei Mensch und Tier.

Kapitel 2: Material und Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Humane Endothelzellen aus der Vena umbilicalis (HUVEC) -Anlegen einer Primärkultur

Humane Endothelzellen (Human umbilical vein endothelial cells – HUVEC) wurden nach der Methode von Jaffe et al. (1973) aus der Vena umbilicalis menschlicher Nabelschnüre isoliert.

Die Präparation erfolgte unter sterilen Bedingungen. Hierbei wurden die Nabelschnüre zunächst von außen mit Ethanol-Lösung (70%) gereinigt. Nach Aufsuchen der Vena umbilicalis wurde in jedes ihrer beiden Enden ein Dreiwegehahn eingeführt und dieser mit einem Kabelbinder befestigt. Nun wurde die Vene mehrmals mit steriler kalzium- und magnesiumfreier phosphatgepufferter Salzlösung (Phosphate buffered saline, PBS) gespült, bis das im Nabelschnurgefäß befindliche Blut weitgehend entfernt war. Die Vene wurde anschließend mit erwärmter Dispase II-Enzymlösung gefüllt und für ca. 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Hierbei lösen sich die Endothelzellen von der darunter liegenden Muskelschicht. Anschließend wurde die Dispase-Zell-Suspension aus der Nabelschnurvene abgelassen und in einem sterilen Zentrifugationsröhrchen aufgefangen. Durch Nachspülen mit Endothelzell-Kulturmedium konnte die Ausbeute an Zellen erhöht werden, und zugleich wurde das Enzym Dispase II durch das im Kulturmedium enthaltene fetale Kälberserum (FCS 2%) neutralisiert. Die Zellsuspension wurde bei 1500 U/min und einer Temperatur von 37°C für 5 Minuten zentrifugiert, wobei sich die Endothelzellen als Pellet absetzten. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in Endothelzell-Kulturmedium aufgenommen und unter vorsichtigem Mischen resuspendiert. Die Zellen wurden dann in mit 2%-iger Gelatine beschichteten 75-cm²-Kulturflaschen transferiert und bei 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95% und einer atmosphärischen CO₂-Konzentration von 5% im Brutschrank kultiviert. Innerhalb von 24 Stunden wurden die Endothelzellen auf der Gelatineschicht adhärent, so dass durch einen Mediumwechsel verbleibende Erythrozyten und andere nicht adhärente Zellen des peripheren Blutes entfernt werden konnten.

2.1.2. Kultivieren und Passagieren von Endothelzellen

Die Endothelzellen wurden in Endothelzell-Kulturmedium unter Zusatz von 2 Vol.-% fetalem Kälberserum (FCS), 1µg/ml Hydrocortison, 0,1ng/ml hEGF (human endothelial growth factor), 1ng/ml hbFGF (human basic fibroblast growth factor), 0.4% ECGS (endothelial cell growth supplement), 5ng/ml Amphotericin B und 50µg/ml Gentamicin kultiviert. Das Medium der adhärent wachsenden Zellen wurde nach spätestens drei Tagen gewechselt. Waren die Endothelzellen konfluent in der mit Gelatine beschichteten 75cm²-Kulturflasche gewachsen, so wurden sie mit Hilfe von Trypsin-EDTA-Lösung passagiert und in einem Verhältnis von 1:4 bis 1:8 gesplittet. Zunächst wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen kurz mit 10ml PBS-Puffer gewaschen. Nach Abnahme des PBS-Puffers und Zugabe von 5ml Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen durch leichtes Klopfen an den Seiten der Kulturflasche die Zellen von der Gelatine gelockert. Das Ablösen war unter dem Mikroskop als ein Abrunden der Zellen erkennbar. Durch Zugabe von 10ml Kulturmedium mit 2 Vol.-% FCS wurde der enzymatische Vorgang gestoppt, da das im Medium enthaltene FCS das Enzym Trypsin inaktiviert. Anschließend wurde die Endothelzellsuspension in ein steriles 50ml-Plastikröhrchen transferiert und für 5 Minuten bei 1000 U/min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun in frischem Kulturmedium resuspendiert und die Zellen in gelatinebeschichteten Petrischalen oder Multi-Loch-Platten angesetzt. Für die Experimente wurden Zellen der Passagen zwei und drei verwendet. Zur Bestimmung von Mediatoren aus dem Überstand und der zugehörigen mRNA-Konzentration im Zelllysat wurden die Zellen in 12-Loch-Platten kultiviert. Für den Affymetrix[®] GeneChip Expressions-Array und für die rtPCR wurden die Endothelzellen in Petrischalen (Durchmesser 100 mm) kultiviert.

2.1.3. Durchführung der HUVEC-Experimente

Vierundzwanzig Stunden vor jedem Experiment wurde das Kulturmedium gegen Medium, das kein Hydrocortison enthielt, ausgetauscht. In diesem cortisonfreien Medium verblieben

die HUVEC bis zum Experiment, um einen möglichen Einfluss des Cortisons auf die im Experiment provozierte Entzündungsreaktion auszuschliessen.

Unmittelbar vor dem Experiment wurde das cortisonfreie Medium durch ein Medium ersetzt, welches keine Wachstumsfaktoren und kein FCS, sondern lediglich die bereits aufgeführten Antibiotika enthielt, um Störeffekte dieser Zusätze weitestgehend auszugrenzen. Die Zellen wurden dann unter anderem mit rekombinatem humanen APC behandelt und für weitere 5 bis 48 Stunden inkubiert. Für die Quantifizierung von sezernierten Proteinen wurden die Zellüberstände aus den einzelnen Löchern der Platte abgesaugt und in sterile 1,5 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Die Überstände wurden für 10 Minuten bei 1500 U/min bei 4°C zentrifugiert, um einzelne abgelöste Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die so gewonnenen Überstände bis zur Durchführung von ELISA-Untersuchungen bei -20 °C eingefroren.

Für die mRNA-Quantifizierung wurde ein Zellysate hergestellt, indem in jedes Loch (*well*) der 12-Loch-Platte 200µl eines Zellyse-Puffers zugesetzt wurden. Bei einer erfahrungsgemäßen Zelldichte von im Mittel 120 000 Endothelzellen pro *well* ergab sich somit eine Konzentration von durchschnittlich 600 000 Zellen pro 1ml Zellysate. Das Lysate wurde nach Überführung in sterile und RNase-freie 1,5ml-Zentrifugationsröhrchen bei -80°C bis zur mRNA-Bestimmung eingefroren.

2.2. Affymetrix® GeneChip Expressions Array

Für die Untersuchung der Genexpression mehrerer tausend Gene zu einem Zeitpunkt wurde ein Affymetrix® GeneChip Expressions Array durchgeführt. Dafür wurde der GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array benutzt (Affymetrix, High Wycombe). Dieser Array liefert einen umfassenden Überblick auf das transkribierte menschliche Genom. Das Prinzip des Affymetrix® GeneChip Expressions-Array besteht darin, exprimierte Gesamt-Ribonucleinsäure (RNA) in eine markierte und kopierte RNA (cRNA) umzuschreiben, um diese an die dafür passenden Oligonukleotidsequenzen aus einem Chip zu binden und schließlich sowohl qualitativ als auch quantitativ zu messen. Der hierfür verwendete, mit Quarz beschichtete Array besitzt 1,3 Mio. verschiedene Oligonukleotid-Sets, die jeweils eine Länge von 25 Nukleotiden aufweisen. Dadurch können 47000 verschiedene transkribierte Varianten, von denen 38500 bekannte menschliche Gene sind, untersucht werden. Die Abbildung 2-1 veranschaulicht das Prinzip des GeneChip Expressions Array. Die einzelnen Schritte werden im Weiteren näher erläutert.

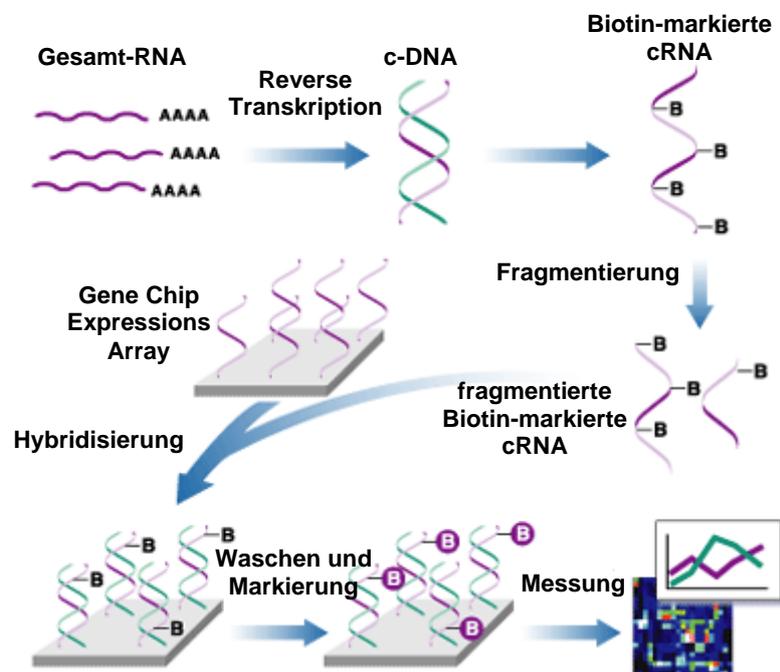


Abbildung 2-1: Prinzip des GeneChip Expressions Array

(modifiziert nach: www.affymetrix.com/technology/ge_analysis/index.affx)

2.2.1. Isolierung von Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des Quiagen RNeasy Kits® aus HUVEC isoliert. Zu Beginn der Isolation wurde der Zellüberstand abgenommen und die Zellen einmal mit 10ml PBS gewaschen. Anschließend wurde durch Zugabe eines Guanidinisothiocyanat-haltigen Lysepuffers, der außerdem 1% β -Mercaptoethanol enthielt, die Zellen vom Gelatineboden gelöst und aufgeschlossen. Um möglichst große Mengen des Zelllysats zu gewinnen, wurde ein Zellscraper zu Hilfe genommen. Dieser wurde einige Male über den Gelatineboden geführt. Das Zelllysate wurde mit einer Pipette aufgesogen und in ein Spezialröhrchen (*Quiashredder spin column*) zur Auftrennung von RNA und sonstigen Zellbestandteilen durch zweiminütiges Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit überführt. Zu dem Eluat wurde die gleiche Menge 70%igen Ethanol gegeben und auf eine Silica-Gel-Säule (*RNeasy mini column*) aufgetragen, die bei 12000rpm zentrifugiert wurde. Die RNA wurde durch das Ethanol präzipitiert und so auf der Silica-Gel-Membran der *RNeasy mini column* gebunden. Der Durchfluss enthielt somit keine RNA und konnte entfernt werden. In der *RNeasy mini column* wurden die anschließenden Schritte zur Aufreinigung der RNA durchgeführt. Nach einem Waschschrift mit einem Puffer, der Guanidinisothioxyanat und Ethanol enthielt, wurde eine Lösung mit DNase auf den Filter gegeben, um vorhandene Rest-DNA zu zerstören. Danach folgten drei weitere Waschschrift. Durch mehrmaliges Zentrifugieren, zuletzt bei höchster Geschwindigkeit (13000U/min), wurde restliche Flüssigkeit aus dem Filter entfernt. Um die gereinigte RNA zu eluieren, musste nun H_2O_{DEPC} (=Reinstwasser) auf die Membran pipetiert werden. Nach einem weiteren Zentrifugationsschrift enthielt der Durchfluss die gereinigte Gesamt-RNA.

Die gewonne Gesamt-RNA konnte unter Verwendung eines Spektrophotometers auf ihre Konzentration (RNA-Konzentration ($\mu\text{g}/\text{dl}$) = $A_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$) und ihren Reinheitsgrad überprüft werden. Als Maß für die Reinheit dient der Quotient der Absorptionen, gemessen bei den Wellenlängen 260nm und 280nm (A_{260}/A_{280} -Ratio). Die A_{260}/A_{280} -Ratio der Proben soll für optimale Reinheit zwischen 1,8 und 2,1 liegen.

2.2.2. Synthese doppelsträngiger cDNA aus RNA

Die Synthese von ds-cDNA aus der messenger-RNA (mRNA) besteht aus der *first-strand*-Reaktion und der *second-strand*-Reaction.

Die *first-strand*-Reaktion wird wiederum in drei Schritte (Primerhybridisation, Temperaturanpassung und *first-strand*-Synthese) untergliedert. Zunächst wurde zur Primerhybridisation zu einer Menge von ca. 5,0µg mRNA ein T7-oligo(dT)Primer (100pmol mRNA final) und H₂O_{DEPC} gegeben und bei 70°C für 10 Minuten inkubiert. Der Primer hybridisiert in diesem Schritt die mRNA. Bei der Temperaturanpassung wurde dem Ansatz DTT (10mM mRNA final) und ein dNTP-Gemisch (500µM final je Basentyp) unter gepufferten Bedingungen zugesetzt und für 2 Minuten bei 42°C inkubiert. Im letzten Schritt wurde durch Zugabe von SuperScriptII RT (200U final) und Inkubation des gesamten Ansatzes bei 42°C für eine Stunde durch reverse Transkription die *first-strand* DNA synthetisiert.

Zur *second-strand*-Synthese wurden nun folgende Reagentien und Enzyme zugesetzt: dNTP-Gemisch (200µM final je Basentyp), E.coli DNA Ligase (10U final), E.coli DNA Polymerase I (40U final), E.coli RNase H (2U final), ein spezieller *Second-Strand*-Reaktionspuffer und H₂O_{DEPC}. Der Ansatz wurde bei 16°C für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von T4 DNA Polymerase (10U) und einer Inkubation bei 16°C für weitere 5 Minuten die ds-cDNA synthetisiert. Zum Schluss wurde noch EDTA (0,5M) zugefügt.

2.2.3. Aufreinigung von ds-cDNA

Die Aufreinigung der ds-cDNA erfolgte mit dem GeneChip® *Sample Cleanup Modul*. Die ds-cDNA wurde zusammen mit einem cDNA-Bindungs-Puffer auf eine Säule gegeben und dann mit cDNA-Waschpuffer gewaschen. Die ds-cDNA wurde mit dem cDNA-Elutions-Puffer wieder von der Säule eluiert.

2.2.4. Synthese Biotin-markierter cRNA durch In-Vitro-Transkription (IVT)

Verwendet wurde der Enzo® BioArray™ HighYield™ RNA *Transcript Labeling Kit* (Enzo Life Sciences, Inc.; Farmingdale, USA).

Für die Synthese von Biotin-markierter cRNA wurden zu der ds-cDNA H₂O_{DEPC}, spezifischer Reaktionspuffer, Biotin-markierte Ribonukleotide, DTT, RNase-Inhibitor-Gemisch und T7 RNA-Polymerase gegeben und bei 37°C für 4,5 Stunden inkubiert und ungefähr alle 30-45 Minuten kurz gemischt.

2.2.5. Aufreinigung von cRNA

Hierfür wurde wie im Schritt 2.2.3. das GeneChip® *Sample Cleanup Modul* verwendet.

Es wurde cRNA zusammen mit Wasser, IVT-Bindungspuffer und 100% Ethanol auf eine Säule aufgetragen. Die cRNA wurde dann wieder mit IVT-cRNA-Wasch-Puffer gewaschen und dann mit RNase-freiem Wasser eluiert.

2.2.6. Fragmentierung von Biotin-markierter cRNA

Die gereinigte cRNA wurde durch Versetzen mit einem speziellen Fragmentierungspuffer und H₂O_{DEPC} und Inkubation bei 94°C für 35 Minuten fragmentiert.

2.2.7. Hybridisierung der Proben mit dem Array

Vor dem Aufbringen der cRNA auf den Array wurde ein spezieller Hybridisierungscocktail, der fragmentierte Biotin-markierte cRNA, das Kontroll-Oligonucleotid B2, Hybridisierungskontrolllösung, Hering-Sperma-DNA und acetyliertes Bovines Serum Albumin (BSA) enthielt, angesetzt und bei 99°C für 5 Minuten inkubiert. Währenddessen wurden die Array-Chips mit Hybridisierungspuffer gefüllt und bei 45°C für 10 Minuten mit 60rpm im Hybridisierungssofen (Affymetrix® GeneChip® *Hybridisation Oven* 640) inkubiert. Anschließend wurde der Hybridisierungspuffer gegen den Hybridisierungscocktail ausgetauscht und die Chips bei 45°C für 16 Stunden und 60rpm inkubiert. In dieser Zeit bindet die fragmentierte und markierte cRNA an die auf den Chips befindlichen Oligonucleotidsonden.

2.2.8. Waschen und Markieren der Array-Chips

Die beladenen Chips wurden nun in einem automatisierten Verfahren unter Verwendung der Affymetrix® GeneChip® *Fluidics Station* 400 nach dem Färbeprotokoll EukLE-ws2-v4 mit zwei speziellen Waschpuffern in mehreren Zyklen gewaschen, um die Chips von nicht hybridisierten RNA-Resten und anderen Verunreinigungen zu befreien. Danach wurde eine Markierungslösung, die Streptavidin-Phycoerythrin enthielt, auf die Chips aufgebracht. Diese bindet sich an die Biotin-markierten und auf dem Array fixierten cRNA-Fragmente.

2.2.9. Scannen der Array-Chips und Auswertung

Die Chips wurden anschließend unter Verwendung des Affymetrix® GeneChip® Scanners (GCS 3000) computergesteuert von einem Laser bei einer Extinktionswellenlänge von 488nm

abgetastet. Der Anteil des bei einer Wellenlänge von 570nm emittierten Lichtes ist der Menge an gebundenen markierten cRNA-Fragmenten proportional.

Zur Auswertung des Affymetrix® GeneChip Expressions-Array wurde zunächst basierend auf der relativen Signalintensität der *Perfect-match*-Paare (eine 25-Oligonukleotid-Sequenz, die mit dem gesuchten Gen übereinstimmt) und der *Miss-match*-Paare (eine 25-Oligonukleotidsequenz, die dem gesuchten Gen bis auf eine Base entspricht) ein Detektionswert p (zwischen 0 und 1) und ein Signalwert für jedes Probenpaar auf dem Array errechnet. Der p -Detektionswert wurde in verschiedene Abschnitte unterteilt, anhand derer die Signale in ein anwesendes ($P = \text{Present} = \text{Anwesend}$) oder abwesendes ($A = \text{Absent} = \text{Abwesend}$) Signal klassifiziert wurden. Die Grenzen hierfür waren: $P \leq 0,05 < \text{keine Veränderung} < 0,065 \leq A$.

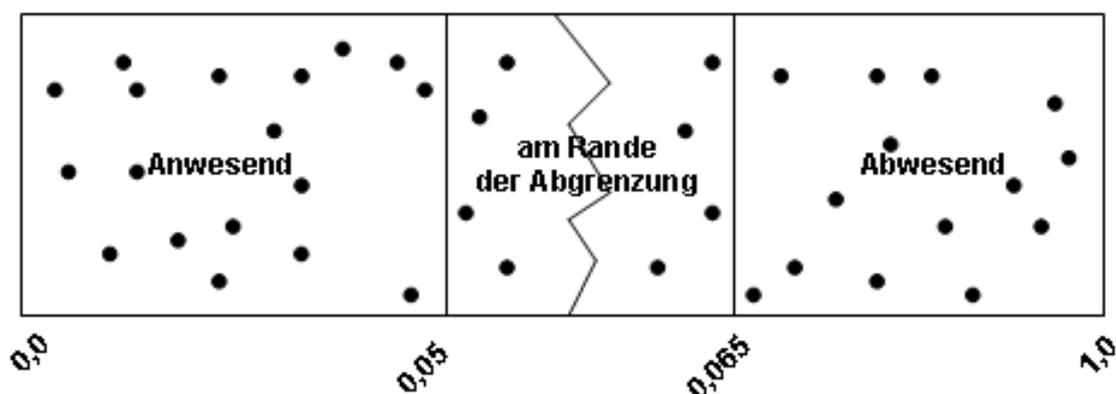


Abbildung 2-2: Einteilung des p -Detektions-Wertes (modifiziert nach: Affymetrix® GeneChip Expressions Array Auswertung)

Bei dem Vergleich von zwei Ansätzen (z.B. Kontrolle versus rhAPC-Behandlung) lieferte das Programm *Data Mining Tool* den p -Veränderungswert. Dieser wurde zwischen den Begrenzungen 0 und 1 in steigend ($I = \text{Increase}$), grenzwertig ansteigend ($MI = \text{Marginal Increase}$), keine Veränderung (*No change*), grenzwertig absteigend ($MD = \text{Marginale Decrease}$) und absteigend ($D = \text{Decrease}$) eingeteilt: $I < 0,002 < MI \leq 0,002667$ und $0,997333 < MD < 0,998 \leq D$. Dieser Wert gibt die Veränderung der Signalintensität an.

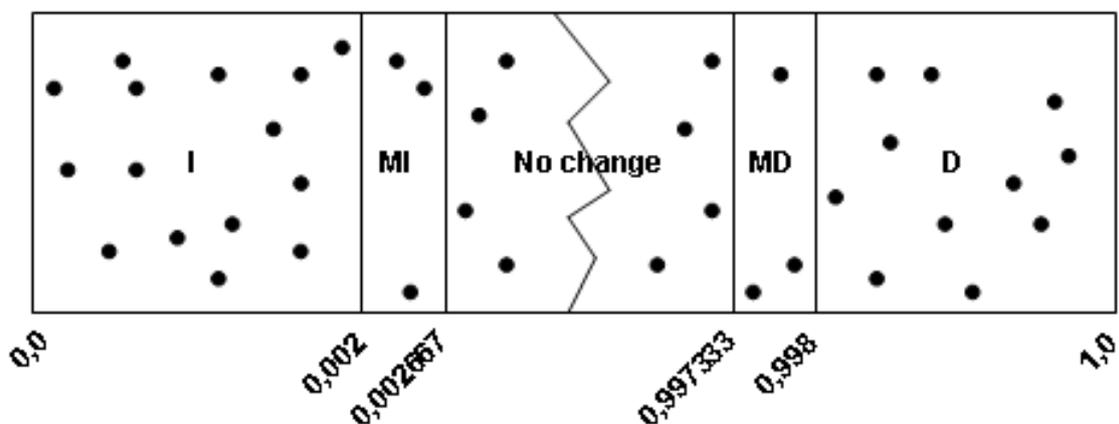


Abbildung 2-2: Klassifizierung des p-Veränderungswertes (mosifiziert nach: Affymetrix® GeneChip Expressions Array Auswertung)

Die *Signal Log Ratio*, die durch die *One-step Tukey's Biweight* Methode vom Programm errechnet wird, kann zwischen -1 und 1 liegen. Wenn die *Signal Log Ratio* einen Wert von -1 hat, dann bedeutet das eine zweifache Abnahme und im positiven Fall eine zweifache Zunahme. Die *Signal Log Ratio* ist jedoch ein statistischer Parameter, der durch eine bestimmte Formel in den empirischen Wert *Fold Change* umgewandelt wird:

$$\text{Fold Change} = \begin{cases} 2^{\text{Signal Log Ratio}} & (\text{wenn Signal Log Ratio} \geq 0) \\ (-1) \times 2^{-(\text{Signal Log Ratio})} & (\text{wenn Signal Log Ratio} < 0) \end{cases}$$

Dieser *Fold Change* wurde in der Tabelle 3-1 zur Veranschaulichung der Steigerung oder Abnahme einzelner Gene unter rhAPC-Behandlung eingesetzt.

2.3. Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (rtPCR)

Zur semiquantitativen Messung von mRNA des Wachstumsfaktors TGF- β 2 und des Chemokins Fractalkine wurde eine rt-PCR durchgeführt. Die rtPCR besteht darin, gewonnene mRNA in eine cDNA zu überschreiben und diese zu amplifizieren. Die vervielfältigte cDNA wird anschließend auf einem Agarose-Gel qualitativ und semiquantitativ dargestellt. Die einzelnen Schritte werden im folgenden näher erläutert.

2.3.1. Isolierung von Gesamt-RNA

Zunächst wurde Gesamt-RNA mit Hilfe des Quiagen RNeasy Kits[®] aus Endothelzellen isoliert, wie bereits in Abschnitt 2.2.1. beschrieben.

2.3.2. Reverse Transkription

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase wurden von der Gesamt-RNA DNA-Kopien hergestellt, die das Ausgangsprodukt für die Polymerase Kettenreaktion (PCR) darstellen.

Zunächst wurden die RNA-Proben durch Zugabe von RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 3 μ g/ μ l gebracht. Nun wurden 6 μ l poly(dT)15-Primer (25 μ M), welcher zum Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA komplementär ist, zu 6 μ l Gesamt-RNA-Probe hinzupipettiert. Nach dem Aufschmelzen der Sekundärstrukturen der mRNA für 4 Minuten bei 72°C, konnte der p(dT)15-Primer sich anlagern, und es folgte nun die Reverse Transkription unter Verwendung von 0,6 μ l AMV (*avian myeloblastosis virus*) Reverse Transkriptase. Im nachfolgenden Schritt wurden 33 μ l Mastermix je Probe zugegeben, der aus folgenden Komponenten bestand: RNase-freies Wasser, reverse Transkriptase-Puffer, dNTP-Mix in einer finalen Konzentration von 220 μ M, RNase Inhibitor in einer

Konzentration von 40U/ μ l und BSA in einer Konzentration von 10mg/ml. Nun erfolgte über 90 Minuten bei 42°C die Reverse Transkription. Die Denaturierung der DNA/RNA-Hybridhelix erfolgte danach über 10 Minuten bei 94°C. Mit der so gewonnenen cDNA konnte nun direkt die Polymerasekettenreaktion angeschlossen werden.

2.3.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Methode der PCR basiert auf der Verwendung von DNA-Polymerase (Taq-Polymerase), die eine cDNA-Matrize in wiederholten Replikationsschritten mehrfach kopiert. Dabei wird die Polymerase von kurzen spezifischen Oligonukleotidprimern, die an der DNA-Matrize am Anfang und am Ende der gewünschten DNA-Sequenz ankoppeln, geleitet. Neben der Sequenz des zu untersuchenden Gens, wie hier die Gensequenzen von TGF- β 2 und von Fractalkine, wird zugleich in einem zweiten Ansatz das sogenannte Housekeeping-Gen Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH), das ubiquitär vorhanden ist und als interne Kontrolle dient, amplifiziert.

Zu jeder cDNA-Probe wurden 48 μ l Mastermix zugegeben, der folgende Komponenten enthielt: RNase-freies Wasser, 200 μ M dNTP-Mix, 300nM spezifischer TGF- β 2-, Fractalkine- bzw. GAPDH-Primer, PCR-Puffer und BSA in einer finalen Konzentration von 100ng/ μ l, sowie 0,5 μ l Taq-Polymerase je Probe. Dann wurden die Proben in Temperaturprogrammierte PCR-Geräte eingesetzt. Die PCR bestand aus der initialen Denaturierung der DNA-Stränge, gefolgt von der Anlagerung (sogenanntes Annealing) der spezifischen Primer, der anschließenden Amplifikation und der finalen Elongation. Das PCR-Programm für GAPDH wurde aus der Veröffentlichung von Hicok et al. 1998 entnommen. Die PCR-Abläufe für TGF- β 2 wurden aus dem Protokoll der Firma R&D-Systems, Wiesbaden übernommen. Das Fractalkine PCR-Programm ist der Veröffentlichung von Sukkar MB et al. 2004 nachempfunden.

Das PCR-Programm für GAPDH lautet wie folgt:

- 1) 5min bei 94°C (initiale Denaturierung)
- 2) 30sec bei 94°C (Denaturierung)
- 3) 60sec bei 55°C (Annealing)
- 4) 2min bei 72°C (Amplifikation)
- 5) Wiederholung der Schritte 2-4 für weitere 16, 18 bzw. 20 Zyklen
- 6) 5min bei 72°C (finale Elongation)
- 7) Stop bei 4°C

Das PCR-Programm für TGF- β 2 lautet wie folgt:

- 1) 4min bei 94°C (initiale Denaturierung)
- 2) 45sec bei 94°C (Denaturierung)
- 3) 45sec bei 55°C (Annealing)
- 4) 45sec bei 72°C (Amplifikation)
- 5) Wiederholung der Schritte 2-4 für weitere 20 Zyklen
- 6) 10min bei 72°C (finale Elongation)
- 7) Stop bei 4°C

Das PCR-Programm für Fractalkine lautet wie folgt:

- 1) 1min bei 94°C (initiale Denaturierung)
- 2) 30sec bei 94°C (Denaturierung)
- 3) 30sec bei 62°C (Annealing)
- 4) 30sec bei 72°C (Amplifikation)
- 5) Wiederholung der Schritte 2-4 für weitere 34 Zyklen
- 6) 1min bei 72°C (finale Elongation)
- 7) Stop bei 4°C

Die PCR wurde zum einen mit dem Kühlen der Proben auf 4°C und zum anderen mit der Zugabe von 5µl Stop-Lösung beendet. Diese Stop-Lösung enthielt RNase-freies Wasser, Glycerin, 0,5M EDTA (pH8.0), 10%-iges SDS und 1%-ige Bromphenolblau-Lösung, wobei letztere das Identifizieren der Proben beim Auftragen in die Taschen des Gels erleichtern sollte.

2.3.4. Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese wird die DNA entsprechend ihrer Länge aufgetrennt. Da DNA negativ geladen ist, wandert sie entsprechend ihres molekularen Gewichts in Richtung der positiv angelegten Spannung.

Zuerst wurde das Gel vorbereitet, indem 2g Agarose in 100ml TAE unter Zufuhr von Hitze vollständig gelöst wurden. Dieser Lösung wurden 5µl Ethidium-Bromid zugegeben, welches sich an die in der PCR entstandene DNA anlagert und die Bande unter UV-Licht fluoreszieren lässt. Das Gel wurde dann blasenfrei in die Gelkammer gegossen und polymerisierte

innerhalb von 20 Minuten aus. Die Probenaschen wurden mit TAE-Puffer aufgefüllt, und es wurden je 10 μ l der PCR-Produkte vorsichtig in die Taschen pipettiert. Um das Molekulargewicht der DNA-Fragmente abschätzen zu können, wurde in die erste Tasche des Gels 10 μ l eines Standards (100Basenpaar (bp) *Ladder*) pipettiert, welcher nach jeweils 100 Basenpaaren eine Bande ergibt. Das Gel wurde nun für ca. 90 Minuten einer Spannung von 120 Volt ausgesetzt. Danach konnten die im Gel gewanderten spezifischen DNA-Banden bei UV-Durchleuchtung dokumentiert werden. Die Banden für GAPDH bestehen aus 452 Basenpaaren. Aus 279 Basenpaaren besteht der Wachstumsfaktor TGF- β 2. Die Fractalkine-Banden setzen sich aus 887 Basenpaaren zusammen.

2.3.5. Densitometrie

Die Auswertung der Bandenintensität erfolgte semiquantitativ mittels Densitometrie. Dafür wurde das Computerprogramm AIDA verwendet.

Die Banden von TGF- β und Fractalkine wurden dabei in Verhältnis zu den GAPDH-Banden gesetzt. Die Ratio TGF- β 2/GAPDH und Fractalkine/GAPDH wurden für die Auswertung herangezogen.

2.4. Enzyme-linked immunsorbent assay (ELISA)

Zur Quantifizierung von Chemokinen, Wachstumsfaktoren oder Prostaglandinen im Zellüberstand von HUVEC wurden kommerziell erhältliche Elisa-Kits (R&D Systems GmbH, Wiesbaden) verwendet.

Zur Untersuchung der Fractalkine- und TGF- β 2-Konzentration im Zellüberstand wurden nicht-kompetitive Elisas benutzt. (Abb. 2-2) Beim nicht-kompetitiven Elisa bindet das nachzuweisende Antigen an eine mit spezifischen Antikörper-beschichtete Platte. Ein Enzym-gekoppelter Detektions-Antikörper bindet an den Antigen-Primärantikörper-Komplex (sogenanntes Sandwich-System). Das Enzym am Detektions-Antikörper spaltet ein hinzugefügtes Substrat, und es kommt zu einer Farbreaktion, die proportional zum Gehalt an Antigen in der Probe ist.

Der kompetitive Elisa (Abb. 2-3) wurde bei der Quantifizierung der 6-keto-PGF- 1α -Konzentration angewendet. Hierbei findet im Gegensatz zum nicht-kompetitiven Elisa eine Farbreaktion statt, deren Farbintensität antiproportional zu dem Gehalt an Antigen in der Probe ist. Bei diesem Elisa konkurrieren die Antigene in der Probe mit Enzym-gebundenen Antigenen um die Bindungsstellen der Antikörper, die auf der Mikrotiterplatte aufgebracht sind. Je mehr Antigen in der Probe ist und an die Antikörper bindet, umso weniger können die Enzym-gekoppelten Antigene an die Antikörper auf der Platte binden und eine Farbreaktion zeigen.

Die Extinktion wurde jeweils mittels eines Photometers bestimmt. Für jedes zu quantifizierende Protein wurde anhand von Standards mit bekannten Konzentrationen eine Eichkurve erstellt, anhand derer die Konzentration des zu bestimmenden Antigens in der jeweiligen Probe ermittelt werden konnte.

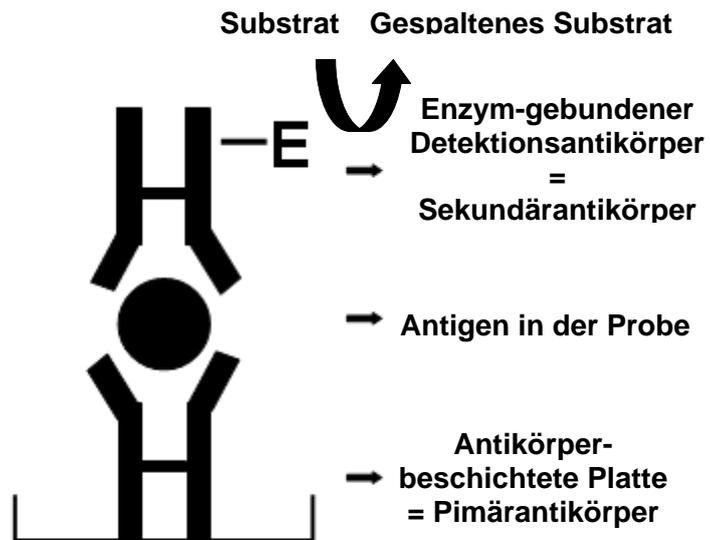


Abb. 2-2: Nicht kompetitiver Elisa zur Bestimmung der Fractalkine- bzw. TGF- β 2-Konzentration

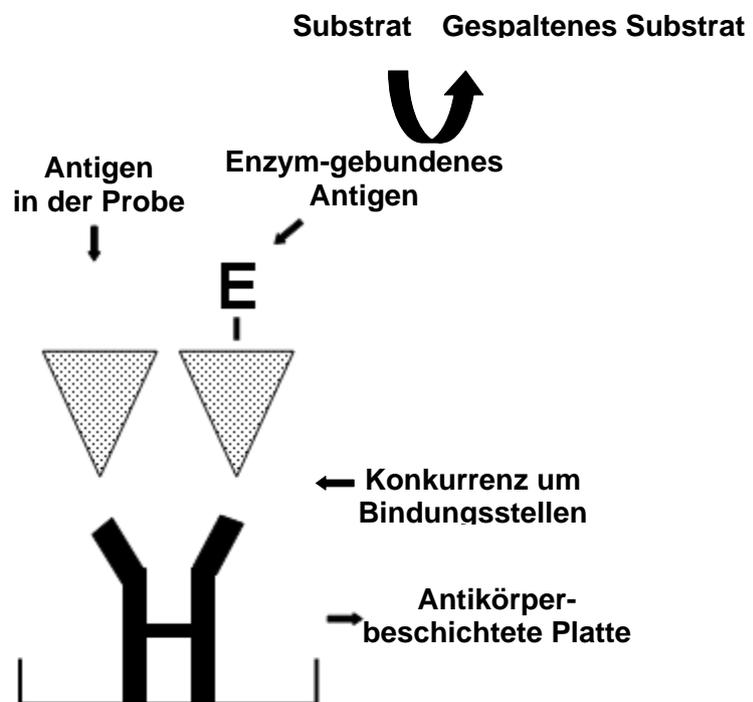


Abb. 2-3: Kompetitiver Elisa zur Messung von 6-keto-PGF- $_{1\alpha}$ in der Probe

2.4.1. Fractalkine Immunoassay

Zur Messung von Fractalkine aus den Zellüberständen von Endothelzellen wurde der nicht-kompetitive Human Fractalkine/CX3CL1-Elisa von der Firma R&D Systems (Wiesbaden) verwendet.

Zunächst wurde eine Mikrotiterplatte mit dem Fractalkine-spezifischen Primärantikörper (*Capture Antibody*) beschichtet. Während einer Inkubation von zwei Stunden fand die Bindung von Fractalkine an diesen Primärantikörper statt. Anschließend konnte sich im Laufe von zwei Stunden der Sekundärantikörper (*Detection Antibody*) an den Komplex binden. Durch Zugabe von Streptavidin-HRP (*horseradish-peroxidase*) wurde das zugefügte Substrat (H_2O_2 und Tetramethylbenzindin) am Sekundärantikörper gespalten. Dadurch kam es zu einer Farbreaktion, die proportional zur Konzentration an Fractalkine aus der Probe war. Die Extinktion wurde bei 450nm mittels eines Elisa-Readers gemessen.

2.4.2. Transforming Growth Factor- β 2 Immunoassay

Zur Quantifizierung von TGF- β 2 im Zellüberstand von Endothelzellen wurde der nicht-kompetitive Quantikine® Human TGF- β 2 Immunoassay von der Firma R&D Systems (Wiesbaden) verwendet.

Um TGF- β 2 zu messen, muss zunächst das inaktive TGF- β 2 im Zellüberstand aktiviert werden. Dieses wurde durch Einsatz von zwei Aktivierungsflüssigkeiten erreicht. Dabei werden LAP und LTBP proteolytisch von TGF- β 2 abgespalten. Zur Aktivierung von TGF- β 2 wurde als erstes die Lösung HCL (1N) zu den Proben hinzugegeben und gut gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde dem Gemisch die Lösung NaOH (1,2N) / 0,5M HEPES zugefügt und wiederum gut gemischt. Nach Zugabe von *Assay Diluent* wurden Standard bzw. die zu messenden Proben auf die Mikrotiterplatte gegeben und anschließend inkubiert. Während dieser Zeit bindet TGF- β 2 an den Primärantikörper. Nach mehrmaligem Waschen wurde der Sekundärantikörper hinzugefügt. Die Mikrotiterplatte wurde wieder bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert, um den Sekundärkörper an

den TGF- β 2-Primärantikörper-Komplex binden zu lassen. Nach der Inkubation wurde eine Farblösung aufgetragen, und die Farbreaktion wurde nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten mit einer Schwefelsäure-Lösung gestoppt. Mit Hilfe eines Elisa-Readers konnte die Farbentwicklung bei 450nm gemessen werden.

2.4.3. 6-keto-Prostaglandin F_{1 α} Immunoassay

Zur Quantifizierung von Prostazyklin im Zellüberstand von Endothelzellen wurde ein kommerziell erhältlicher Elisa-Kit verwendet. Da das Prostazyklin eine kurzlebige Substanz ist und im Zellüberstand nur eine Halbwertszeit von 2-3 Minuten hat, wurde sein stabiles Abbauprodukt 6-keto-Prostaglandin-F_{1 α} (6-keto-PGF_{1 α}) mittels ELISA gemessen. 6-keto-PGF_{1 α} entsteht durch die nicht-enzymatische Hydratation des Prostazyklins.

Für die Quantifizierung von Prostazyklin mittels ELISA wurde der Zellüberstand abgenommen und Indomethacin in einer Konzentration von 10 μ g/ml zugegeben. Indomethacin ist ein Inhibitor der Cyclooxygenase, der die weitere Entstehung von Prostazyklin nach Beendigung des Experiments verhindern sollte.

Der 6-keto-PGF_{1 α} -Elisa basiert auf einer kompetitiven Bindung, bei der das 6-keto-PGF_{1 α} aus der Probe mit einem alkalischen, phosphatase-gebundenen 6-keto-PGF_{1 α} um die Bindung an den Primärantikörper konkurriert. Während einer Inkubationszeit von zwei Stunden bindet der Primärantikörper an einen Sekundärantikörper, der auf der Mikrotiterplatte haftet. Nach mehrmaligem Waschen zur Entfernung nicht gebundenen Materials wurde eine pNPP-Lösung (p-Nitrophenyl-Phosphat-Lösung) in die *Wells* gegeben, die mit am Sekundär-Antikörper gebundener alkalischer Phosphatase reagierte. Innerhalb von 60 Minuten führte dies zu einer Farbentwicklung, die umgekehrt proportional zur Konzentration an 6-keto-PGF_{1 α} aus der Probe war. Die Farbentwicklung konnte mit Hilfe eines Elisa-Readers bei 405nm gemessen werden.

2.5. Colorimetrischer mRNA-Quantifizierungs-Assay

Zur Quantifizierung der messenger-RNA von COX-1 und COX-2 aus dem Zelllysat von HUVEC wurden kommerziell erhältliche colorimetrische mRNA-Assays (Hersteller: R&D Systems GmbH, Wiesbaden) verwendet.

Zunächst wurden die Zelllysat-Proben mit genspezifischen Biotin-markierten Oligonukleotid-Sonden und Digoxigenin-markierten Sonden in einer Mikrotiterplatte für 60 Minuten bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Während dieser Zeit hybridisierte die Biotin-Sonde spezifisch mit der mRNA eines bestimmten Gens, die Digoxigenin-Sonde unspezifisch mit mRNA. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung auf eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte überführt und für weitere 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler bei 500U/min inkubiert. Hierbei fand die Bindung der mit Biotin markierten mRNA-Sonden-Hybride an das Streptavidin statt. Nach viermaligem Waschen der Platte mit einem spezifischen Wasch-Puffer zur Entfernung des nicht gebundenen Materials wurde ein Anti-Digoxigenin-alkalische-Phosphatase-Konjugat zugesetzt, welches im Laufe einer Inkubationszeit von 60 Minuten an die Digoxigenin-markierte Sonde bindet. Nach einem weiteren Waschschrift wurde eine entsprechende Substratlösung und nach weiteren 60 Minuten eine Verstärkerlösung hinzugefügt. Innerhalb von 30 Minuten führt dies zu einer Farbentwicklung, die in ihrer Intensität proportional der Konzentration an genspezifischer mRNA in der jeweiligen Zelllysat-Probe ist. Nach Zugabe eines Reagenz, welches die Farbentwicklung stoppt, konnte die Extinktion der Proben bei einer Wellenlänge von 490nm und einer Korrekturwellenlänge von 650nm photometrisch bestimmt werden. Dabei war die Intensität der Farbentwicklung proportional zu Konzentration an genspezifischer mRNA in der jeweiligen Zelllysat-Probe. Für jede Mikrotiterplatte wurde anhand von Standards mit bekannter Konzentration eine Eichkurve erstellt, anhand derer die mRNA-Konzentration in der jeweiligen Probe quantifiziert werden konnte (in amol/ml).

2.6. Western-Blot

Das Prinzip des Western Blot besteht darin, dass Proteine zunächst mittels Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und anschließend elektrophoretisch auf eine Membran übertragen werden. Die Membran bindet die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen. Dies bezeichnet man als „Blotten“.

Für eine Immunfärbung wird das gesuchte Protein (Antigen) mit spezifischen Antikörpern auf der Membran fixiert und gefärbt. Vor der Reaktion eines Blots mit Antikörpern müssen die restlichen Proteinbindungsstellen der Blotmembran mit einem Blocker abgesättigt werden. Daraufhin wird die Membran zuerst mit einem spezifischen anti-Antigen-Antikörper (1. Antikörper) inkubiert, an welchen ein zweiter markierter Antikörper bindet. Mit Hilfe der Farbmarkierung des zweiten Antikörpers wird die Position des Antigens auf dem Blot mittels einer enzymatischen Reaktion sichtbar gemacht.

2.6.1. Vorbereitung der Zellen und Zellernte

Der Zellüberstand wurde von den Petrischalen (d=10cm) abgenommen. Dann wurden die Endothelzellen mit eiskühlem PBS gewaschen, mit einem Zellscraper abgekratzt und in ca. 1ml PBS, welches Proteaseinhibitoren enthielt, aufgenommen. Dieses Zell-PBS-Gemisch wurde in ein 1,5ml Zentrifugationsröhrchen überführt, bei ca. 4000U/min und einer Temperatur von 4°C für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das so gewonnene Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur eigentlichen Western-Blot-Durchführung gelagert.

2.6.2. Vorbereitung der Proben

Zu den gefrorenen Zellpellets wurden jeweils 50µl Tris-Glycin SDS-Probenpuffer hinzugegeben. Dieser Puffer enthielt final: 125mM Tris-HCl (pH-Wert 6,8), 20% (w/v) Glycerol, 4% (w/v) SDS, 0,01% (w/v) Bromphenol-Blau und 3% (w/v) DTT (Dithiothreitol). Die Seife SDS (Sodiumdodecylsulfat) lagert sich an Proteine an und bildet negativ geladene SDS-Protein-Komplexe. Nach vorheriger Reduktion mit DTT denaturiert SDS die Proteine und unterbindet Protein-Protein-Wechselwirkungen. Somit unterscheiden sich die SDS-Protein-Komplexe nur noch in ihrer Größe bzw. in ihrem Molekulargewicht und haben vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften.

Anschließend wurden die Endothelzellen mit dem Ultraschalldesintegrator drei Mal für je 3 Sekunden mit Ultraschallwellen im Frequenzbereich von ca. 10kHz beschallt. Hierdurch wurden die Zellen aufgebrochen. Danach wurden die Zellen bei 95°C für 5 Minuten erhitzt. Dies verstärkte die denaturierende Wirkung des SDS auf Proteine und inaktiviert Proteasen.

Nach einer Zentrifugation bei 15000U/min bei 20°C für 10 Minuten wurde der Überstand abgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt.

2.6.3. Proteinbestimmung

Um eine für den Western-Blot geeignete, standardisierte Menge an Protein einsetzen zu können, wurde die Proteinkonzentration in den Proben gemessen. Dazu wurde ein kommerziell erhältlicher Protein Assay verwendet, der auf dem Bradford Protein Assay (Bradford MM 1976) beruht. Der Assay basiert auf den besonderen Eigenschaften des Farbstoffs Coomassie Blue G-250: In Perchlorsäure gelöst nimmt dieser Farbstoff eine rot-braune Farbe an, ist er jedoch an Protein gebunden, bleibt seine blaue Farbe erhalten.

Nach Zugabe von in Perchlorsäure-gelöstem Coomassie Blue G-250 wird die blaue Farbe bzw. der Proteingehalt einer Verdünnungsreihe, die 1-20µg BSA enthielt, photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt und so eine Eichkurve erstellt. Mit Hilfe dieser

Eichkurve konnte nun die Proteinkonzentration in den Proben errechnet werden und das für den Western Blot geeignete Probenvolumen festgelegt werden. Dabei lagen die Proteinmengen bei 30µg oder 15µg je Geltasche.

2.6.4. Durchführung des Western Blots

Zunächst wurde das Novex 10%-Tris-Glycine Gel (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) mit Aqua dest. gespült und in die Gelelektrophorese-Kammer gespannt. Dann wurde die Kammer mit folgendem Laufpuffer (pH-Wert 8,3) aufgefüllt: 24mM Tris Base, 1,44% (w/v) Glycin und 0,1% (w/v) SDS.

Nachdem die Marker (Molekulargewicht zwischen 20 und 120kDa) sowie die Proben mit einer Mikropipette in die Geltaschen aufgetragen worden waren, wurde eine Spannung von 125 Volt bei variabler Stromstärke angelegt. In ca. 90 Minuten wanderten die Proteine zur Anode. Dabei wurden sie durch den Molekularsiebeffekt der porösen Polyacrylamidmatrix nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Währenddessen konnte die PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid-Membran) 30 Sekunden in Methanol quellen, wurde dann kurz mit Aqua dest. abgespült und in Transferpuffer eingeweicht (pH-Wert 8,3; 30mM Tris base, 1,8% (w/v) Glycin, 0,25% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol).

Gel und Membran wurden daraufhin zwischen Filter und Schwämmen in ein Blot-Modul eingeklemmt. Das Blot-Modul wurde innen mit identischem Transferpuffer und zur Kühlung außen mit Aqua dest. aufgefüllt. An seinen Seitenwänden waren Platindrähte als Elektroden angebracht. Bei einer Spannung von 30 Volt und variabler Stromstärke wurden die Proteine innerhalb von 2 Stunden auf die Membran transferiert.

Anschließend wurde die Membran zunächst drei Mal mit TBST (50mM Tris Hydrochlorid, 150mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20) gewaschen, 1 Stunde mit der Blocklösung und schließlich 12-18 Stunden mit dem Primärantikörper (Ziege-IgG-anti-human-COX-2, Verdünnung: 1:5000) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurde der zweite Antikörper (Esel-anti-Ziege-IgG gekoppelt an *Horse radish peroxidase* (HRP), Verdünnung: 1:1000) aufgetragen. Darauf folgten vier weitere Waschschrte, um unspezifische Bindungen zu

lösen. Schließlich wurden die COX-2 Proteinbanden auf der Membran durch ein Chemolumineszenz-Messgerät detektiert (Fuji Luminescent Image Analyzer LAS-1000), gespeichert und densitometriert (AIDA –Software).

2.7. Material

2.7.1. Kulturmedium

Endothelial Cell Growth Medium wurde bezogen von PromoCell GmbH (Heidelberg). Dem Medium wurden folgende Bestandteile, enthalten im „Supplement Pack“ (Firma PromoCell GmbH, Heidelberg), zugesetzt: fetales Kälberserum (FCS) in einer finalen Konzentration von 2%, Hydrocortison (final 1µg/ml), hEGF (human endothelial growth factor) 0,1ng/ml final, hbFGF (human basic fibroblast growth factor) 1ng/ml final, ECGS (endothelial cell growth supplement) mit Heparin 0,4% final, Amphotericin B (final 5ng/ml) und Gentamicin (final 50µg/ml).

2.7.2. Substanzen, Reagenzien und Chemikalien

- 100bp *Ladder*: Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- 10x PCR-Puffer: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- 5xRT-Puffer: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Agarose: Sigma®, Taufkirchen
- Antikörper gegen PGIS (Prostaglandin I₂ Sythase), polyklonal: Cayman, Ann Arbor, USA
- Aqua dest. Spüllösung: Delta Select GmbH, Dreieich
- ATAP2 (sc-13503), monoklonaler IgG Antikörper gegen den PAR-1-Rezeptor: Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
- Bovines Serum Albumin (BSA): Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Bromphenolblau 1%: Sigma®, München
- Ceprotin 500 I.E. (Protein C): Baxter GmbH, Heidelberg
- *Complete Mini* (Proteaseinhibitoren): Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

- Desinfektionsmittel *Antifect Liquid*: Schülke u. Mayr, Norderstadt
- Dispase II Lösung: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- DMSO (Dimethylsulfoxid): Sigma®, Taufkirchen
- DTT: Sigma®, Taufkirchen
- EDTA 0,5M: Merck AG, Darmstadt
- Eisessig: Merck AG, Darmstadt
- EPCR-Antikörper (RCR-252 = blockierend, RCR-92 = nicht blockierend): Wurde freundlicherweise von Prof. Kenji Fukudome, Saga Medical School, Japan, zur Verfügung gestellt.
- Esel anti-Ziege IgG-HRP (sc-2033): Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
- Ethanol: J. T. Baker, Deventer, Holland
- Ethidium-Bromid 10mg/ml: Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- Fractalkine Primer Paare (5`-AACTCGAAATGGCGGCACCTT-3`; anti-sense: 5`-ATGAATTACTACCACAGCTCCG-3`): Applera Deutschland GmbH, Oligo Factory, Weiterstadt
- GAPDH-Primer Paare (5`-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3`; anti-sense: 5`-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3`): Applera Deutschland GmbH, Oligo Factory, Weiterstadt
- Gelatine Lösung 2%, Typ B: Sigma®, Taufkirchen
- H₂O_{DEPC}: Ambion Ltd., Huntingdon, United Kingdom
- HCl: Merck AG, Darmstadt
- HEPES: Sigma®, Taufkirchen
- Human TGF-β2-Primer Paare: R&D Systems GmbH, Wiesbaden
- Immobilon-P Transfer Membran (PVDF-Membran): Milipor Inc., Billerica, USA
- Indomethacin: Sigma®, Taufkirchen

- Lepirudin (Refludan® rekombinantes humanes Hirudin): Aventis Pharma GmbH, Bad Soden
- *Magic Mark* (Marker für Western-Blot): Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- NaOH: Merck AG, Darmstadt
- Novex 10%-Tris-Glycin Gel, SDS-PAGE: Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- Novex Tris-Glycin SDS Laufpuffer: Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- Novex Tris-Glycin SDS Probenpuffer: Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- NS-398 (COX-2 Inhibitor): Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
- p(dT)₁₅-Primer: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- PAR-1-Agonist (TFLLRNPNDK-NH₂-Hydrogencarbonatsalz): Serva GmbH, Heidelberg
- PAR-2-Agonist (H-Ser-Leu-Ile-Gly-Arg-Leu-NH₂-Trifluoracetatsalz): Bachem Distribution Services GmbH, Weil am Rhein
- PBS (*Phosphate buffered saline*, Ca²⁺ und Mg²⁺ frei): N.V. Invitrogen S.A., Merelbeke, Belgien
- PCR Nucleotid Mix: Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- Proben-Verdünnungslösung: R&D Systems GmbH, Wiesbaden
- Prostaglandin H₂: Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
- Reagenz-Verdünnungslösung (Konzentrat): R&D Systems GmbH, Wiesbaden
- Rekombinates humanes aktiviertes Protein C (rhAPC): Eli Lilly, Indianapolis, USA
- Reverse Transkriptase, AMV: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- RNasin Ribonuklease Inhibitor: Promega GmbH, Mannheim
- Sam11 (sc-13504), monoklonaler IgG Antikörper gegen den PAR-2-Rezeptor: Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
- SDS 10% (Sodium Dodecyl Sulfat): Sigma®, Taufkirchen
- β-Mercaptoethanol: Sigma®, Taufkirchen

- Stop-Lösung: R&D Systems GmbH, Wiesbaden
- Substrat-Lösung: R&D Systems GmbH, Wiesbaden
- TAE-Puffer (50x): AppliChen GmbH, Darmstadt
- Taq DNA Polymerase: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Thrombin aus humanem Plasma: Merck Biosciences GmbH, Fa. Calbiochem, Schwalbach/Ts.
- TNF- α : R&D Systems GmbH, Wiesbaden
- Trypsin-EDTA-Lösung, flüssig: Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- Tween 20: Sigma®, Taufkirchen
- Zell-Lyse Diluent Konzentrat: R&D Systems GmbH, Wiesbaden
- Ziege-IgG-anti-human-COX-2 (C-20): Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA

2.7.3. Plastikwaren und Glaswaren

- 10cm Schalen: Gebr. Buddeberg, Mannheim
- 12er *wells*: Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
- 3-Wege-Hähne: Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
- Eppendorf Reaktionsgefäße: Eppendorf AG, Hamburg
- Eppendorf T.I.P.S.: Eppendorf AG, Hamburg
- Falconröhrchen: Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
- Glaszylinder (=Küvette): Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
- Kabelbinder: Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
- Microtiterplatten Nunc®: Nunc GmbH + Co.KG, Wiesbaden

- Nitrilhandschuhe: Semperit Technische Produkte GmbH + Co.KG, Wien
- Perfusorspritze: Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
- Pipetten (5, 10, 20ml): Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
- Probenbecher: Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
- Skalpell: Produkte für die Medizin AG, Köln
- Filter 0,22µm: Millipore GmbH, Schwalbach
- Probenröhrchen: Eppendorf AG, Hamburg
- Tupfer: NOBA Verbandsmaterial Danz GmbH und CoKG, Wetter
- Vinyl-Handschuhe: Rösner-Mautby Meditrade GmbH, Kieferfeiden
- Zellscraper: Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

2.7.4. mRNA Präparation

- *RNeasy® Mini-Kit*: Qiagen GmbH, Hilden
- *RNeasy-Free DNase Set*: Qiagen GmbH, Hilden

2.7.5. Affymetrix® GeneChip Expressions Array

- *Gene Chip® Sample Cleanup Moduls*: Affymetrix, UK Ltd., High Wycombe, United Kingdom
- *GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0*: Affymetrix, UK Ltd., High Wycombe, United Kingdom
- *Hybridization Control Kit*: Affymetrix, UK Ltd., High Wycombe, United Kingdom

- *One Cycle cDNA Synthesis Kit*: Affymetrix, UK Ltd., High Wycombe, United Kingdom
- Enzo® BioArray™ HighYield™ RNA *Transcript Labeling Kit*: Enzo Life Sciences, Inc.; Farmingdale, USA

2.7.6. Elisa-Kits

- 6-keto-Prostaglandin F_{1α} Immunoassay: R&D Systems GmbH, Wiesbaden
- Human Fractalkine/CX3CL1: R&D Systems GmbH, Wiesbaden
- Human Transforming Growth Factor-β2 Immunoassay Quantikine®: R&D Systems GmbH, Wiesbaden

2.7.7. Colorimetrischer mRNA-Quantifizierungs-Assay

- Quantikine® mRNA *Base Kit*: R&D Systems GmbH, Wiesbaden
- Quantikine® mRNA COX-1 *Probes & Calibrator Kit*: R&D Systems GmbH, Wiesbaden
- Quantikine® mRNA COX-2 *Probes & Calibrator Kit*: R&D Systems GmbH, Wiesbaden

2.7.8. Western-Blot

- Bradford Protein Assay, COO Assay Protein *Determination Kit*: Uptima, Monlucon, Frankreich
- Lumi-Light^{Plus} *Western Blotting Kit*: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2.7.9. Geräte

- Affymetrix® Gene Chip Scanner (GCS 3000): Affymetrix, UK Ltd., High Wycombe, United Kingdom
- Affymetrix® Gene Chip *Hybridization Oven* 640: Affymetrix, UK Ltd., High Wycombe, United Kingdom
- Affymetrix® Gene Chip *Fluidics Station* 400: Affymetrix, UK Ltd., High Wycombe, United Kingdom
- Blot-Modul, Xcell™ Blot Modul: Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- Densitometrie-Messgerät: Fuji Imager-Reader LAS 1000: FUJI Film Europe GmbH, Düsseldorf
- ELISA-Reader: LabSystems Multiscan RC: LabSystems, Finnland
- Gel *Jet Imager*: INTAS, Hamburg
- Mikroskop: Leica DM IL: Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
- neo-Lab-Pipettus-akku: neoLab® Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
- Netzgerät für Elektrophorese „Power Station 300“: Axon Labortechnik, Kaiserslautern
- PCR-Gelelektrophoresekammer Model B2: Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

- PTC-220 CNA Engine Dyad™ Peltier *Thermal Cycler*: MJ Research™, Boston, USA
- Pipetten, Eppendorf Reference: Eppendorf GmbH, Hamburg
- Otto Korbischüttler KL2: Gebr. Buddeberg GmbH, Mannheim
- *Savant Speed Vac SC 200*: GMI, Ramsey, Minnesota, USA
- Sanyo -86°C Ultratiefkühlschrank MDR-U71V: Sanyo Fischer GmbH, München
- Sterile Arbeitsbank: HERAsafe: Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
- Ultraschalldesintegrator: Virbacell: Fisher Scientific, GmbH, Schwerte
- Wasserbad: Schüttelwasserbad 1083:GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
- Zellkulturinkubator: HERAcell:Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
- Zentrifuge: Biofuge Primo R:Heraeus Instruments GmbH, Hanau

2.7.10. Computerprogramme

- AIDA Software: Raytest GmbH, Straubenhardt
- Data Mining Tool: Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA
- Excel 2000: Microsoft GmbH Deutschland, Unterschleißheim
- GraphPad InStat®:GraphPad Software, Inc., San Diego, USA
- INTAS GDS® gel Dokumentationssystem: INTAS, Hamburg
- Powerpoint: Microsoft GmbH Deutschland, Unterschleißheim
- Word: Microsoft GmbH Deutschland, Unterschleißheim

2.8. Statistik

Die Statistikauswertung wurde mit dem Programm GraphPad InStat[®], Version 3.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) durchgeführt. Die Abbildungen im Kapitel „Ergebnisse“ wurden unter Verwendung von Microsoft[®] Excel 2000 angefertigt. Sofern nicht anders angegeben, zeigen die Abbildungen jeweils ein repräsentatives Experiment aus einer Gesamtzahl von mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils sechs Einzelmessungen (n=6). Die Daten sind, wie jeweils in der Legende angegeben, dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) oder als Mittelwerte \pm Standardabweichung der Mittelwerte (SEM). Die Daten wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung untersucht. Die Behandlungen wurden mit einer Varianzanalyse (Analysis of Variance – ANOVA) mit nachfolgendem post hoc Test nach Tukey-Kramer miteinander verglichen. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

Kapitel 3: Ergebnisse

3.1. Zellmorphologie von HUVEC

Abbildung 3-1 zeigt aus der menschlichen Nabelschnurvene (*Vena umbilicalis*) isolierte Endothelzellen (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVEC). Für die Experimente wurden Zellen aus der Passage 2 verwendet. Abgebildet sind HUVEC der Passage 2 in 100facher Vergrößerung, aufgenommen 11 Tage nach der Präparation. Die einschichtig auf Gelatine gewachsenen Zellen zeigen das typische Relief konfluent wachsender Endothelzellen.

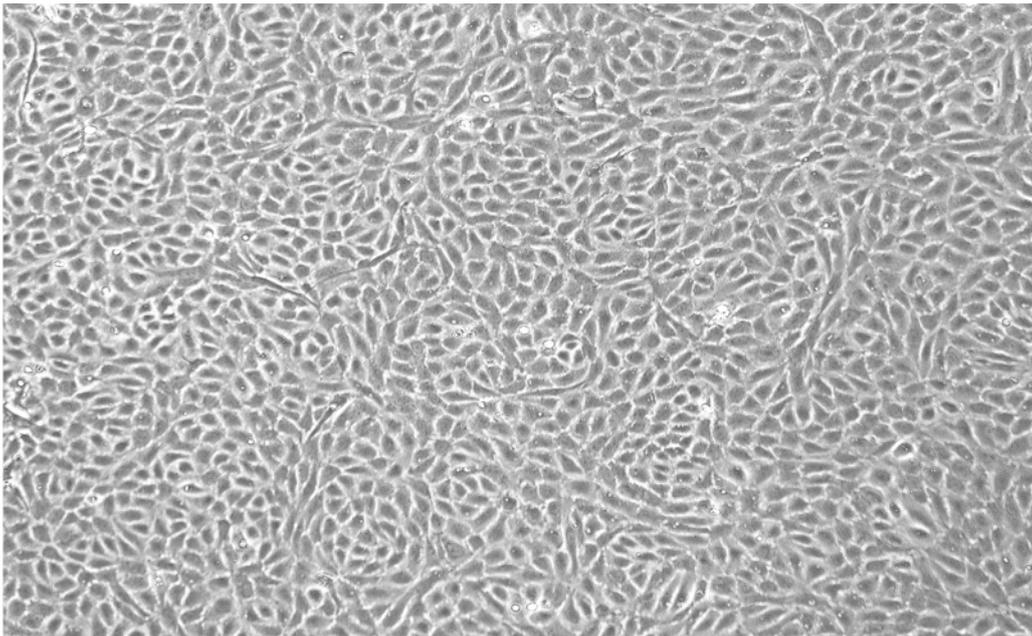


Abbildung 3-1: HUVEC aus der *Vena umbilicalis* der Passage 2, 11 Tage nach Präparation

3.2. Ergebnisse aus dem Affymetrix® GeneChip Expressions Array

Um den Einfluss von rhAPC auf die Expression eines größeren Spektrums an Genen zu untersuchen, wurde ein Gen-Expressions-Array (Affymetrix™) als Screening-Untersuchung durchgeführt. Hierfür wurden die HUVEC für 6 Stunden mit rhAPC (5µg/ml) inkubiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Eine Auswahl an Genen, deren Expression durch die Behandlung mit rhAPC messbar verändert war, ist in Tabelle 3-1 dargestellt. Bei der Auswertung wurden insbesondere Zytokin-Gene, den Zytokinen verwandte Gene, Gene von Wachstumsfaktoren, Chemokine, Adhäsionsmoleküle und Mediatoren aus dem Prostaglandinstoffwechsel berücksichtigt.

Tabelle 3-1:

Name	Funktion	Effekt von rhAPC
Fractalkine	Steuert die Chemotaxis von Monozyten; Adhäsionsmolekül	+++
TGF-β	Steuert die Chemotaxis von Granulozyten und Makrophagen; Aktivierung von Zytokinen	+++
COX-1	konstitutive Cyclooxygenase im Endothel, Prostazyklin-Synthese im Endothel	∅
COX-2	Prostazyklin-Synthese im Endothel unter inflammatorischen Bedingungen	+
IL-8	Chemokin, steuert die Chemotaxis und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten	+++
PGI-2-Synthase	Prostaglandin I ₂ Synthase (PGIS), Prostanoidstoffwechsel	∅
Thrombomodulin	wichtige Bedeutung für die Aktivierung von Protein C im Zusammenhang mit Thrombin	++

Plasminogen-Activator	Förderung der Fibrinolyse	+
E-Selektin	Endotheliales Adhäsionsmolekül	+++
VCAM-1	Adhäsionsmolekül, vermittelt Leukozytenadhäsion	+++
ICAM-1	Adhäsionsmolekül	+++
Superoxid-Dismutase 2 (mitochondrial)	Neutralisation von Sauerstoffradikalen	∅
PDGF-alpha-Kette	Zellwachstum und -migration	∅
PDGF-beta-Kette	Zellwachstum und -migration	++

Tabelle 3-1: Effekt von rhAPC auf die Expression der mRNA ausgewählter immunmodulatorischer Gene von HUVEC.

Die Endothelzellen wurden mit rhAPC (5µg/ml) für 6 Stunden inkubiert. Als Vergleich dienten Kontrollen, die kein rhAPC erhielten (n=2 unabhängige Experimente; +++ ≥ 100%-Steigerung gegenüber Kontrolle durch rhAPC-Behandlung; ++ ≥ 50%-Steigerung gegenüber Kontrolle durch rhAPC-Behandlung; + ≥ 25%-Steigerung gegenüber Kontrolle durch rhAPC-Behandlung; ∅ = keine Veränderung gegenüber unbehandelten Kontrollen).

Von den hier beschriebenen Genen wurden für diese Arbeit das Chemokin Fractalkine, der Wachstumsfaktor TGF-β2 und das Enzym COX-2 ausgewählt und näher untersucht.

3.3. Fractalkine

3.3.1. Wirkung von rhAPC auf die Fractalkine-mRNA-Expression

Um die Effekte von rekombinanten aktivierten Protein C (rhAPC) auf die Fractalkine-mRNA-Expression genauer zu charakterisieren, wurde zunächst eine reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (rt-PCR) durchgeführt.

Konfluent wachsende Endothelzellen wurden für 8h mit rhAPC (10µg/ml) behandelt. Als Kontrollen dienten unbehandelte Endothelzellen, und als Positivkontrolle wurde Thrombin 1U/ml eingesetzt.

Abbildung 3-2 zeigt ein repräsentatives Ergebnis einer rt-PCR und die dazugehörige densitometrische Auswertung. In Höhe von 887 Basenpaaren zeigten sich die spezifischen Fractalkine-Banden, die für das benutzte Primer-Paar charakteristisch sind.

Mittels Densitometrie und Normalisierung in Bezug auf das House-Keeping Gen Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) wurden die Fractalkine-Banden quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass rhAPC in einer Konzentration von 10µg/ml das Signal für Fractalkine um 22% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erhöhte. Die mit Thrombin-behandelten Zellen zeigten eine 128%ige Steigerung der Fractalkine-mRNA-Expression gegenüber unbehandelten Kontrollzellen.

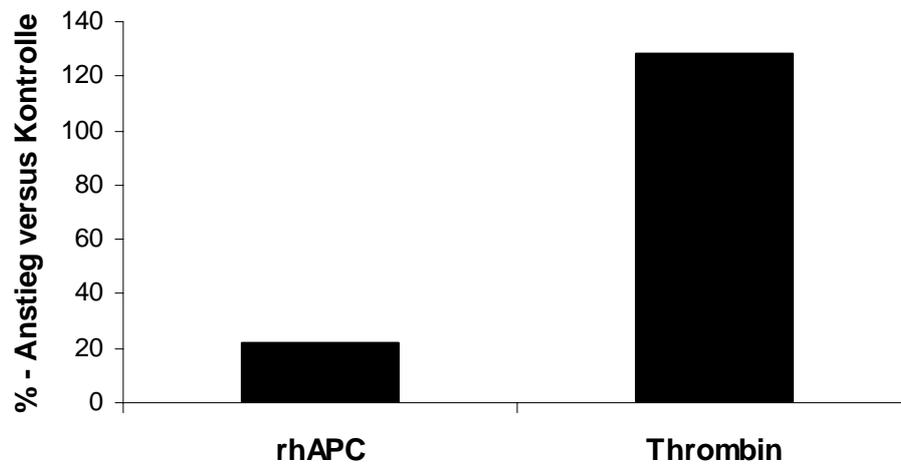
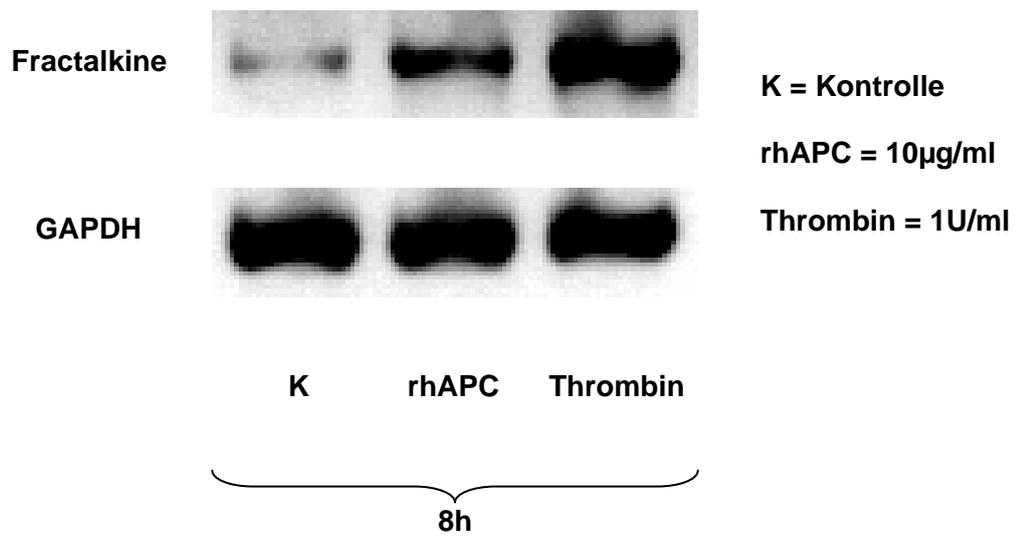


Abb. 3-2: Repräsentative rt-PCR für Fractalkine-mRNA und dazugehöriges Ergebnis der Densitometrie

RhAPC (10µg/ml; Inkubation für 8h) steigert die Expression von Fractalkine-mRNA

Oben: Repräsentative rt-PCR aus zwei vergleichbaren Experimenten.

Unten: Densitometrie und Normalisierung in Bezug auf das House-Keeping Gen GAPDH (Fractalkine/GAPDH-Ratio); Darstellung des prozentualen Anstiegs des Signals bei rhAPC- und Thrombin-behandelten Zellen gegenüber unbehandelten Kontrollzellen.

3.3.2. Wirkung von rhAPC auf die endotheliale Fractalkine-Freisetzung

3.3.2.1. Dosisabhängigkeit

In dem nachfolgend beschriebenen Experiment wurde der Einfluß verschiedener Dosierungen von rhAPC auf die Freisetzung des Chemokins Fractalkine untersucht.

Endothelzellen aus der Passage 2 wurden für 24h mit rhAPC in verschiedener Dosierung (50ng/ml – 10µg/ml) behandelt. Unbehandelte Endothelzellen dienten als Kontrollen.

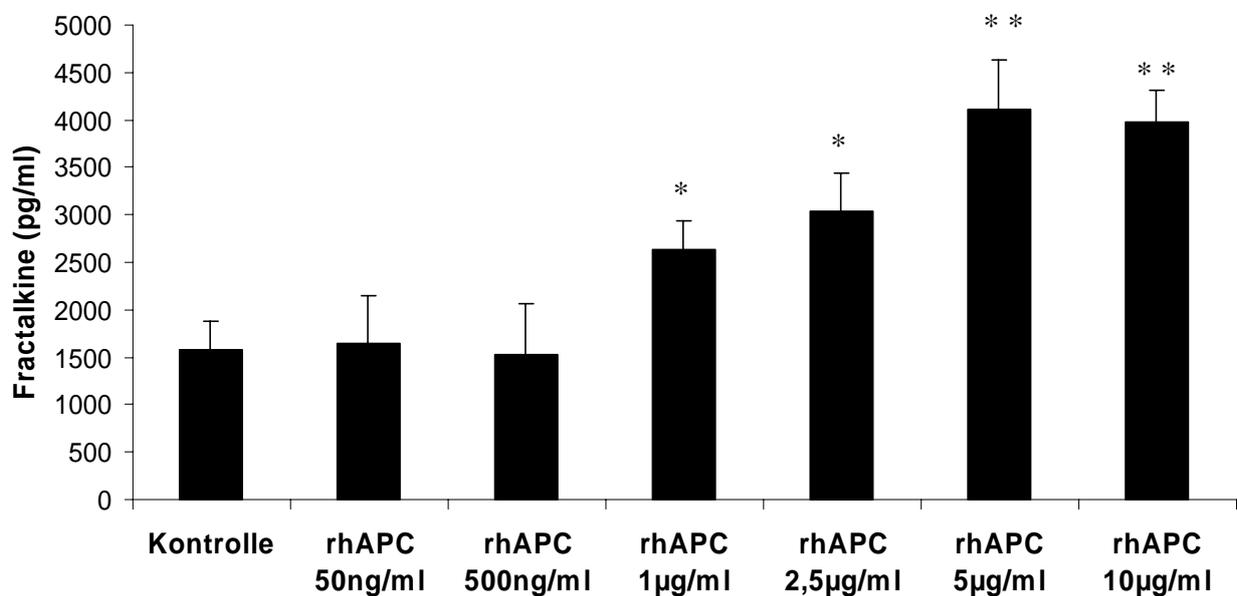


Abbildung 3-3: Dosisabhängige Steigerung der Fractalkine-Freisetzung durch rhAPC.

HUVEC wurden für 24 Stunden mit rhAPC (50ng/ml – 10µg/ml) inkubiert und die Fractalkine-Konzentration im Zellüberstand mittels eines humanen Fractalkine Immunoassays bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus zwei repräsentativen Experimenten mit jeweils 6 Einzelmesspunkten. * $p < 0,01$ versus Kontrolle; ** $p < 0,001$ versus Kontrolle.

Dabei wurde ein dosisabhängiger Anstieg der Fractalkine-Freisetzung erkennbar (Abb. 3-3). Ab einer rhAPC-Konzentration von $1\mu\text{g/ml}$ war die Fractalkine-Freisetzung signifikant gegenüber unbehandelten Zellen erhöht (Kontrolle = $1574,4 \pm 307,8\text{pg/ml}$; rhAPC $1\mu\text{g/ml}$ = $2631,9 \pm 305,3\text{pg/ml}$; $*p < 0,01$). Durch eine Dosissteigerung des rhAPC auf $2,5\mu\text{g/ml}$ ließ sich die Fractalkine-Freisetzung gegenüber der Kontrolle weiter steigern (Kontrolle = $1574,4 \pm 307,8\text{pg/ml}$; rhAPC $2,5\mu\text{g/ml}$ = $3041,4 \pm 403,9\text{pg/ml}$; $*p < 0,01$), ebenso die Verwendung einer rhAPC-Konzentration von $5\mu\text{g/ml}$ (rhAPC $5\mu\text{g/ml}$ = $4108,9 \pm 522,3\text{pg/ml}$; $**p < 0,001$). Eine Anhebung der rhAPC-Konzentration auf $10\mu\text{g/ml}$ bewirkte im Vergleich zur rhAPC-Konzentration $5\mu\text{g/ml}$ keine weitere Zunahme der Fractalkine-Konzentration (rhAPC $5\mu\text{g/ml}$ = $4108,9 \pm 522,3\text{pg/ml}$; rhAPC $10\mu\text{g/ml}$ = $3974,7 \pm 336,78\text{pg/ml}$; $**p < 0,001$ versus Kontrolle).

3.3.2.2. Zeitabhängigkeit

Es wurde die rhAPC-induzierte Steigerung der Fractalkine-Freisetzung im Zeitverlauf untersucht. Dazu wurden die Endothelzellen mit einer rhAPC-Konzentration von $5\mu\text{g/ml}$ stimuliert und die Fractalkine-Konzentration im Zellüberstand zu den angegebenen Zeitpunkten mittels Immunoassay gemessen (Abb. 3-4). Als Vergleich dienten unbehandelte Zellen und solche, die mit Thrombin (1U/ml) behandelt wurden.

Ab einer Inkubationszeit von 24 Stunden ließ sich ein signifikanter Anstieg der Fractalkine-Freisetzung bei rhAPC-behandelten Endothelzellen gegenüber der Kontrolle nachweisen (Kontrolle = $280,7 \pm 223,3\text{pg/ml}$; rhAPC = $1096,2 \pm 236,6\text{pg/ml}$; $**p < 0,001$). Dieser Effekt war gegenüber der Kontrolle bei einer Inkubationszeit von 34 Stunden ebenfalls nachweisbar (Kontrolle = $968,6 \pm 258,7\text{pg/ml}$; rhAPC = $2323,4 \pm 349,5\text{pg/ml}$; $*p < 0,01$); und stieg bei einer Inkubationszeit von 48h weiter an (Kontrolle = $1858,0 \pm 164,5\text{pg/ml}$; rhAPC = $4156,8 \pm 429,9\text{pg/ml}$; $**p < 0,001$).

HUVEC, die mit Thrombin inkubiert wurden, zeigten zu allen untersuchten Zeitpunkten (8-48h) einen signifikanten Anstieg der Fractalkine-Konzentration im Zellüberstand gegenüber den unbehandelten Zellen (Ergebnisse dazu nicht in der Abbildung dargestellt).

Zum Zeitpunkt 8 Stunden konnte bereits ein signifikanter Anstieg festgestellt werden (Kontrolle = $47,4 \pm 67,7$ pg/ml; Thrombin = $816,5 \pm 133,6$ pg/ml; $p < 0,001$). Dieses Ergebnis war ebenso feststellbar nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden (Kontrolle = $280,7 \pm 223,3$ pg/ml; Thrombin = $5813,0 \pm 372,7$ pg/ml; $p < 0,001$), von 34 Stunden (Kontrolle = $968,6 \pm 258,7$ pg/ml; Thrombin = $5347,2 \pm 951,0$ pg/ml; $p < 0,001$) und von 48 Stunden (Kontrolle = $1858,0 \pm 164,5$ pg/ml; Thrombin $12933,0 \pm 631,4$ pg/ml; $p < 0,001$).

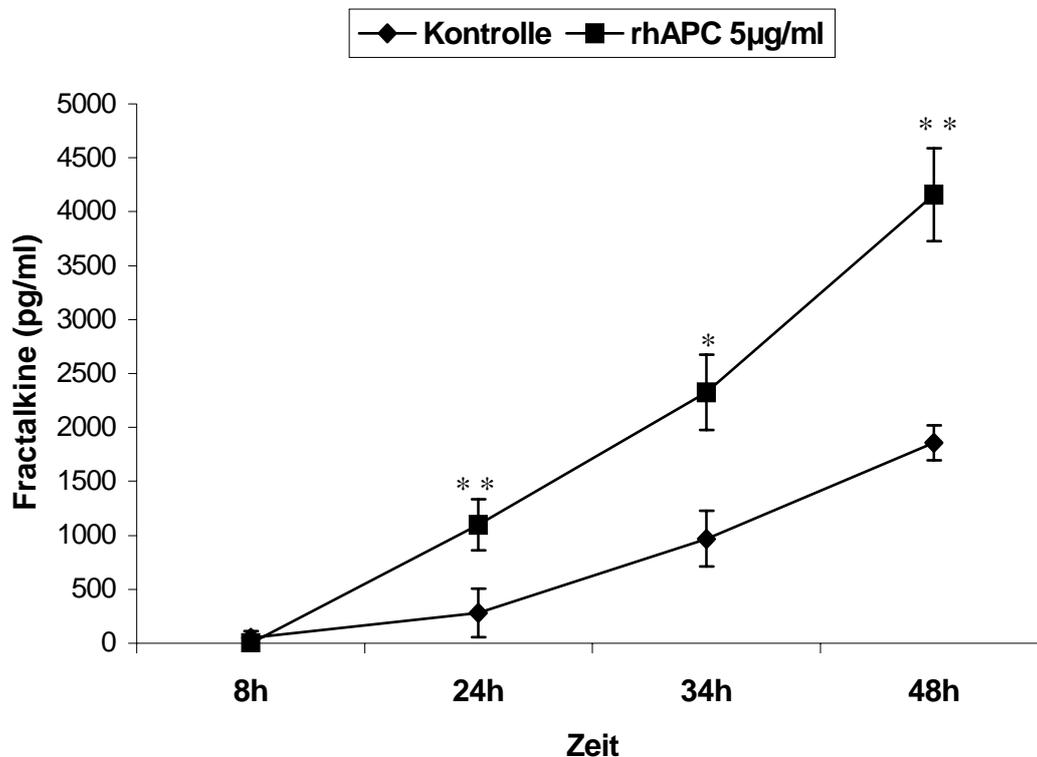


Abbildung 3-4: Wirkung von rhAPC und Thrombin auf die Fractalkine-Freisetzung im Zeitverlauf.

RhAPC bewirkt einen zeitabhängigen Anstieg der Fractalkine-Konzentration im Zellüberstand. HUVEC wurden mit rhAPC (5µg/ml) behandelt. Der Zellüberstand wurde zum angegebenen Zeitpunkt mittels Fractalkine-Immunoassay quantitativ untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n=3 unabhängige Experimente mit jeweils 6 Einzelmesspunkten; * $p < 0,01$ versus Kontrolle; ** $p < 0,001$ versus Kontrolle.

3.3.3. Wirkung von Protein C auf die endotheliale Fractalkine-Freisetzung

Im Folgenden wurde die Wirkung von (nicht aktiviertem) Protein C und rhAPC im Hinblick auf die Fractalkine-Freisetzung verglichen.

Hierfür wurde Fractalkine nach einer Inkubationszeit von 30h in den Zellüberständen von Endothelzellen untersucht, die mit Protein C (160nM) oder rhAPC (5µg/ml) behandelt worden waren. Die Konzentration von 160nM entspricht zweimal der äquimolaren Dosis von 5µg/ml rhAPC. Unbehandelte Endothelzellen wurden als Kontrollen verwendet.

Protein C zeigte keine Steigerung der Fractalkine-Freisetzung in Bezug auf die Kontrolle (Kontrolle = $1049,5 \pm 435,5$ pg/ml; Protein C = $924,4 \pm 163,40$ pg/ml). Hingegen exprimierten Endothelzellen, die mit rhAPC behandelt wurden, nach 30 Stunden signifikant mehr Fractalkine als unbehandelte Endothelzellen (Kontrolle = $1049,5 \pm 435,5$ pg/ml; rhAPC = $2329,1 \pm 294,6$ pg/ml; * $p < 0,001$)

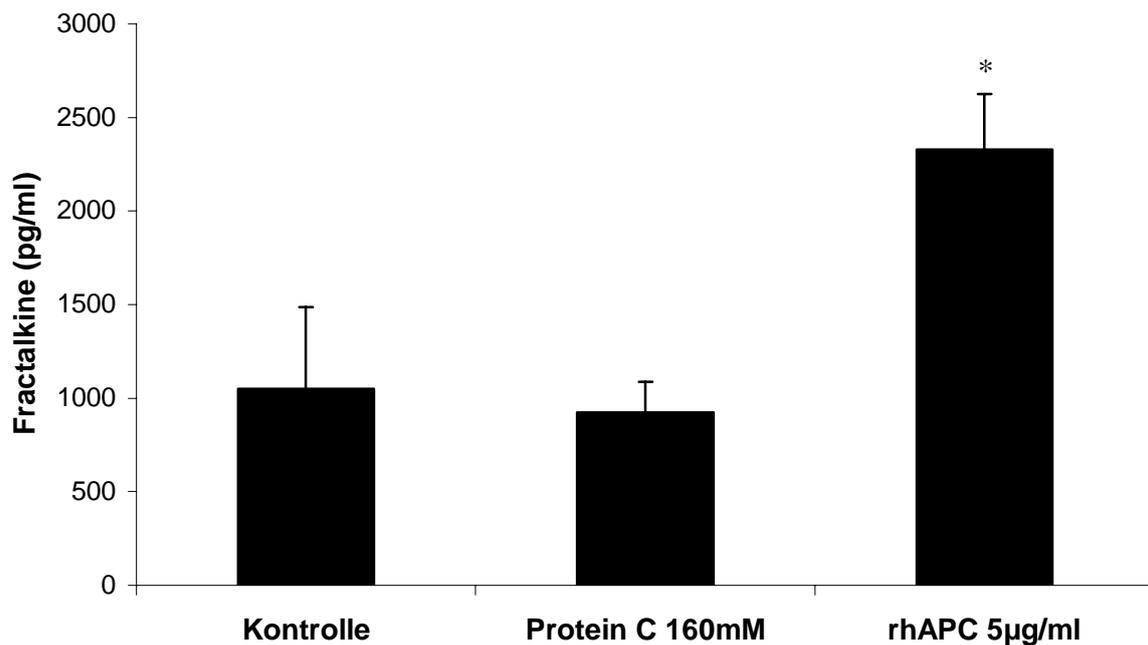


Abbildung 3-5: Wirkung von Protein C auf die Fractalkine-Expression

Konfluente Endothelzellen wurden sowohl mit dem inaktiven Protein C (160nM) als auch mit dem aktivierten Protein C (5µg/ml) für 30h inkubiert. Die Fractalkine-Konzentration wurde mit einem Immunoassay gemessen. Als Vergleich dienten unbehandelte Endothelzellen. Es sind die Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit 6 Einzelmesspunkten dargestellt. Die Signifikanz ist mit * $p < 0,001$ für rhAPC gegenüber der Kontrolle angegeben.

3.3.4. Untersuchungen zur Beteiligung des Protease-aktivierbaren Rezeptors-1 (PAR-1)

Nachfolgende Experimente gingen der Frage nach, ob rhAPC seine Wirkung auf das Chemokin Fractalkine über den Protease-aktivierbaren Rezeptor-1 (PAR-1) entfaltet. Dazu wurden Versuche mit spezifischen PAR-1-Agonisten und PAR-1-Antagonisten durchgeführt.

3.3.4.1. Aktivierung des Protease-aktivierbaren Rezeptors-1 mittels PAR-1-Agonist

Zunächst wurde ein PAR-1-Agonist eingesetzt. Die Endothelzellen wurden 24 Stunden mit dem PAR-1-Agonisten bzw. mit rhAPC behandelt. Im Anschluss wurde aus dem gewonnenen Zellüberstand die freigesetzte Menge an Fractalkine mittels Immunoassay ermittelt. Ab einer Konzentration von 100µM zeigte der PAR-1-Agonist einen signifikanten Effekt auf die Fractalkine-Freisetzung gegenüber der Kontrolle (Kontrolle = $384,4 \pm 112,5$ pg/ml; PAR-1-Agonist 100µM = $684,4 \pm 143,9$ pg/ml; * $p < 0,01$). Der PAR-1-Agonist, eingesetzt in einer Dosierung von 200µM, bewirkte eine weitere Steigung der Fractalkine-Freisetzung (Kontrolle = $384,4 \pm 112,5$ pg/ml; PAR-1-Agonist 200µM = $743,5 \pm 107,0$ pg/ml; ** $p < 0,001$). Die mit rhAPC-behandelten Endothelzellen wiesen ebenso wie der PAR-1-Agonist eine signifikante Freisetzung von Fractalkine gegenüber der Kontrolle auf (Kontrolle = $384,4 \pm 112,5$ pg/ml; rhAPC = $960,6 \pm 121,0$ pg/ml; ** $p < 0,001$).

Es konnte in mehreren Experimenten kein Effekt eines PAR-2-Agonisten (50µM, 100µM, von der Firma Bachem, Weil am Rhein) auf die Freisetzung von Fractalkine gezeigt werden (Daten nicht dargestellt).

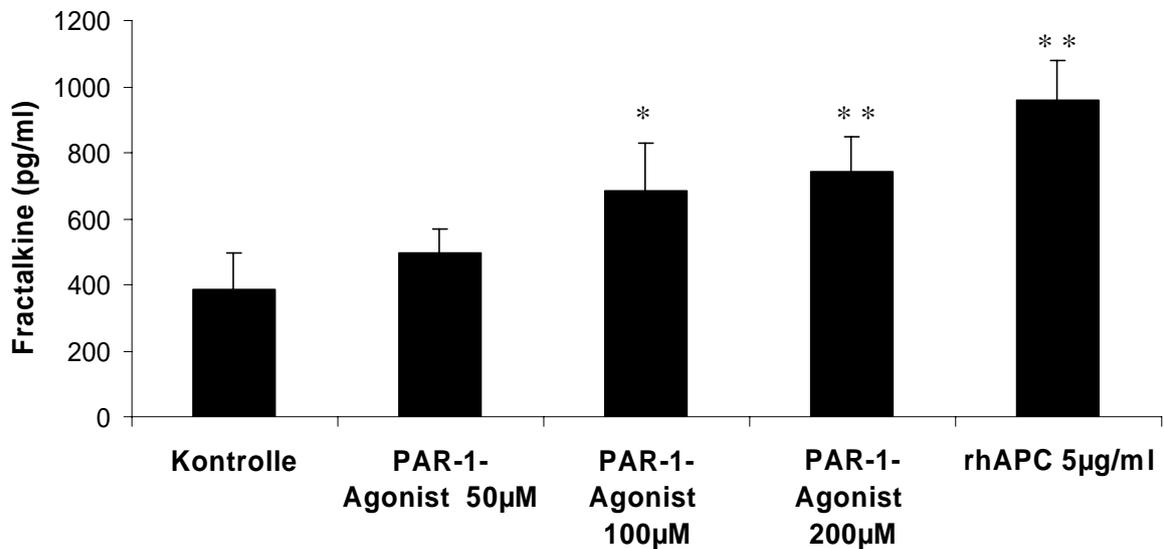


Abbildung 3-6: Wirkung eines PAR-1-Agonisten auf die Fractalkine-Freisetzung bei HUVEC

Konfluente Endothelzellen wurden über 24 Stunden mit dem PAR-1-Agonist (50µM – 200µM) oder rhAPC (5µg/ml) behandelt. Fractalkine wurde mittels Immunoassay bestimmt (MW ± SD, n=1 Experiment mit 6 Einzelmessungen; *p<0,01 gegenüber Kontrolle; **p<0,001 gegenüber Kontrolle).

3.3.4.2. Wirkung von PAR-1- und PAR-2 Antagonisten auf die Fractalkine-Freisetzung

In folgenden Experimenten wurden blockierende Antikörper gegen die Protease-aktivierbaren Rezeptoren PAR-1 und PAR-2 eingesetzt.

Der alleinige Einsatz von ATAP-2 (PAR-1-Antagonist) sowie von SAM-11 (PAR-2-Antagonist) bewirkte eine schwache, jedoch signifikante Hemmung der Fractalkine-Freisetzung gegenüber der Kontrolle (Kontrolle = 539,0 ± 85,9pg/ml; ATAP-2 = 295,8 ± 168,8pg/ml; SAM-11 = 189,0 ± 117,2pg/ml; *p<0,05).

ATAP-2 (20µg/ml), ein Antikörper gegen die Bindungsstelle des Thrombinrezeptors PAR-1, hemmte signifikant die steigernde Wirkung von rhAPC auf die Fractalkine-Freisetzung (rhAPC = 1010,8 ± 117,2pg/ml; rhAPC + ATAP-2 = 497,1 ± 173,3pg/ml; **p<0,001).

Zusätzlich wurde ein blockierender Antikörper gegen den PAR-2, SAM11 (20µg/ml), eingesetzt. Dieser zeigte keine signifikante Hemmung gegenüber der rhAPC-Behandlung (rhAPC = 1010,8 ± 117,2 pg/ml; rhAPC + SAM11 = 843,5 ± 128,0 pg/ml; kein signifikanter Unterschied = n.s.).

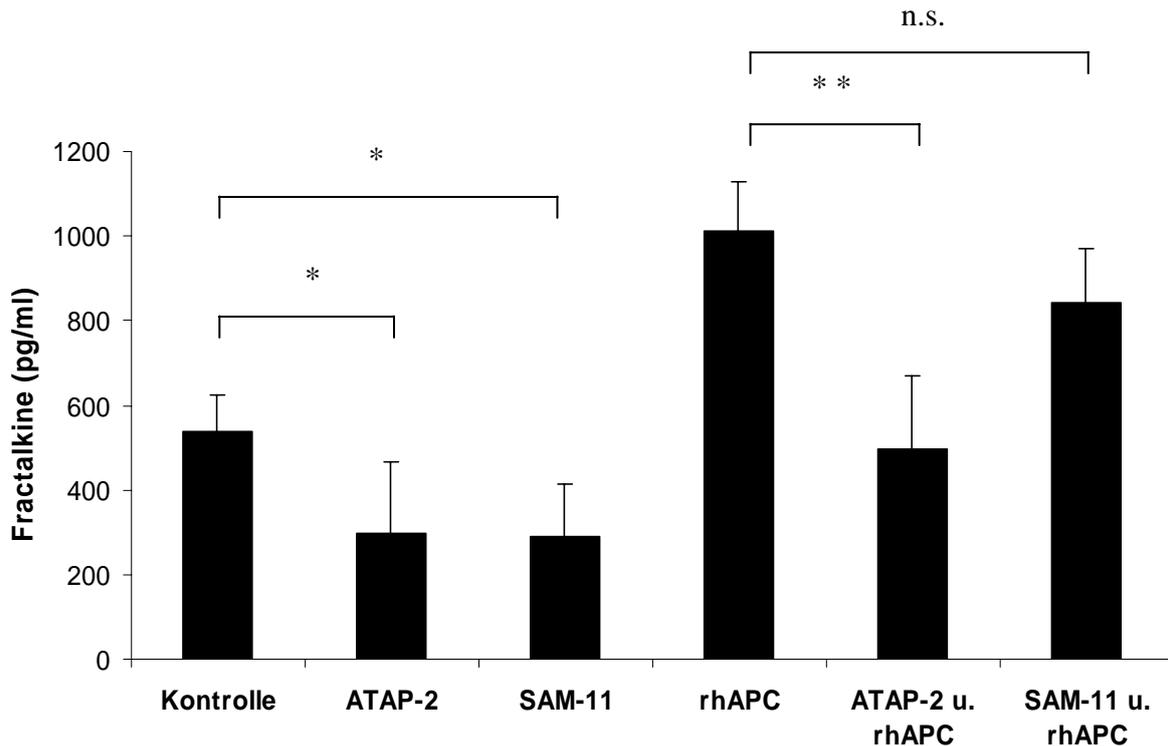


Abbildung 3-7: Wirkung von PAR-1- und PAR-2-Antagonisten auf die Fractalkine-Freisetzung

ATAP-2 (20µg/ml) und SAM-11 (20µg/ml) wurden 30 Minuten vor der Stimulation mit rhAPC (5µg/ml) zu den HUVEC gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde die Fractalkine-Expression im Zellüberstand mittels Immunoassay bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD eines repräsentativen Experiments von insgesamt 3 Versuchen mit jeweils 6 Einzelmesspunkten; *p<0,05 gegenüber der Kontrolle; **p<0,001 gegenüber rhAPC 5µg/ml.

3.4. Transforming Growth Factor- β 2

Im Affymetrix® GeneChip Expressions Array fiel eine Steigerung des Wachstumsfaktors TGF- β 2 unter rhAPC-Einfluss auf. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurden weitere Versuche sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene durchgeführt.

3.4.1. Wirkung von rhAPC auf die Transforming Growth Factor- β 2- mRNA-Expression

Zunächst wurde die Steigerung der TGF- β 2-Expression durch rhAPC auf mRNA-Ebene untersucht. Hierfür wurden konfluente Endothelzellen aus der Passage 2 mit verschiedenen rhAPC-Konzentrationen (50ng/ml – 50 μ g/ml) für 5 Stunden inkubiert. Als Kontrolle dienten nicht behandelte Endothelzellen. Eine kommerziell hergestellte TGF- β 2-mRNA wurde als Positivkontrolle eingesetzt.

Abbildung 3-8 zeigt ein representatives Gel einer rt-PCR und die dazugehörige densitometrische Auswertung in Bezug auf das House-Keeping Gen GAPDH. In Höhe von 279 Basenpaaren zeigten sich die TGF- β 2-Banden, die für das benutzte Primer-Paar typisch sind.

Es konnte bereits bei einer rhAPC-Konzentration von 50ng/ml eine Steigerung der TGF- β 2-mRNA-Expression um 14% gegenüber unbehandelten Kontrollen dargestellt werden. Es zeigte sich, dass bei steigender rhAPC-Konzentration die Expression von TGF- β 2-mRNA zunahm (rhAPC 500ng/ml versus Kontrolle = +26%; rhAPC 10 μ g/ml versus Kontrolle = +33%; rhAPC 50 μ g/ml versus Kontrolle = +79%).

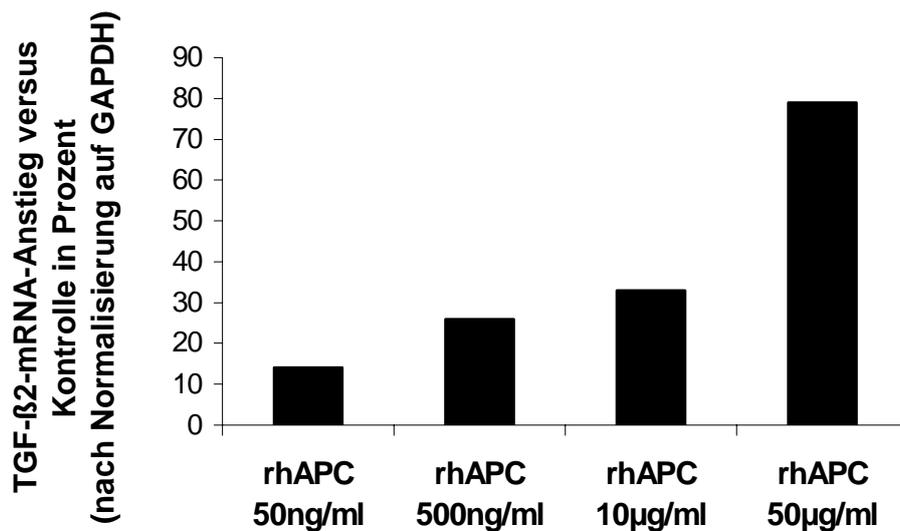
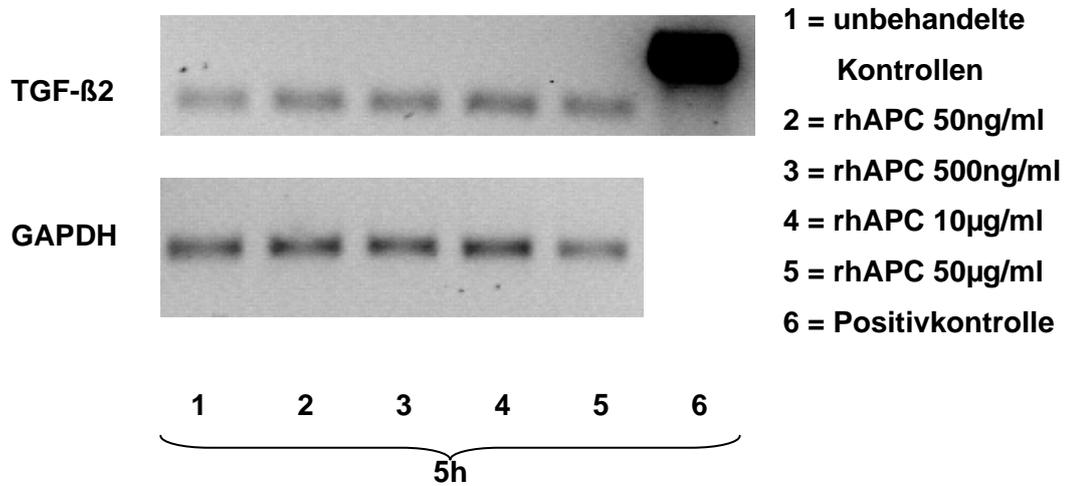


Abbildung 3-8: Repräsentative rt-PCR für TGF-β2-mRNA

RhAPC steigert die dosisabhängige TGF-β2-mRNA-Expression (t=5h)

Oben: Repräsentative rt-PCR aus zwei vergleichbaren Experimenten. Unten: Densitometrie und Normalisierung in Bezug auf das House-Keeping Gen GAPDH; Darstellung des prozentualen Anstiegs des Signals in rhAPC-behandelten Zellen gegenüber Kontrollzellen.

3.4.2. Wirkung von rhAPC auf die Synthese von Transforming Growth Factor- β 2

Im Anschluss an die rt-PCR wurde die Wirkung von rhAPC auf die Freisetzung des Wachstumsfaktors TGF- β 2 untersucht.

Für diesen Versuch wurden Endothelzellen mit rhAPC in zwei unterschiedlichen Dosierungen (500ng/ml oder 5 μ g/ml) für 5 Stunden oder für 9 Stunden inkubiert. Unbehandelte Endothelzellen wurden als Kontrollen herangezogen.

Nach 5-stündiger Inkubationszeit konnte keine Wirkung von rhAPC, sowohl in niedriger als auch in höherer Konzentration, auf die Endothelzellen in Bezug zur TGF- β 2-Freisetzung vermerkt werden (Abb. 3-9).

Nach einer Inkubationszeit von 9 Stunden ließ sich ein signifikanter Anstieg der TGF- β 2-Freisetzung bei rhAPC (5 μ g/ml)-behandelten Endothelzellen gegenüber der Kontrolle nachweisen (Kontrolle = 12,0 \pm 6,9 pg/ml; rhAPC (5 μ g/ml) = 35,0 \pm 5,8 pg/ml; *p<0,001). Die niedrigere rhAPC-Konzentration zeigt keinen Effekt.

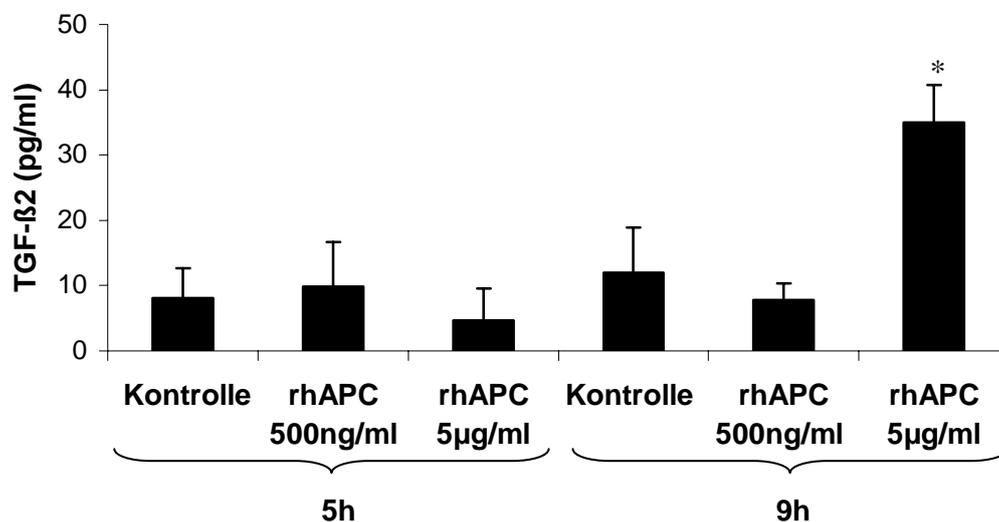


Abbildung 3-9: Steigerung der TGF- β 2-Freisetzung durch rhAPC

HUVEC wurden für 5 bzw. 9 Stunden mit rhAPC (500ng/ml – 5 μ g/ml) inkubiert und die TGF- β 2-Konzentration im Zellüberstand mittels eines humanen TGF- β 2 Immunoassays bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus zwei repräsentativen Experimenten mit jeweils 6 Einzelmesspunkten; *p<0,001 versus Kontrolle.

3.5. Cyclooxygenase-2

Im Affymetrix® GeneChip Expressions Array zeigte sich neben der Steigerung von Fractalkine und TGF-β2 unter anderem auch eine Steigerung des Enzyms Cyclooxygenase-2 bei Endothelzellen, die mit rhAPC inkubiert wurden. Um dieses Ergebnis genauer zu charakterisieren, wurden die folgenden Experimente durchgeführt.

3.5.1. Wirkung von rhAPC auf die Cyclooxygenase-2-mRNA-Expression

3.5.1.1. Dosisabhängigkeit

Zunächst wurde die Abhängigkeit der rhAPC-Dosierung auf die COX-2-mRNA-Expression untersucht (Abb. 3-10).

RhAPC wurde in Dosierungen von 2,5 – 20µg/ml eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 7 Stunden, und als Kontrolle dienten unbehandelte HUVEC.

Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der COX-2-mRNA-Expression ab einer rhAPC-Konzentration von 5µg/ml gegenüber der Kontrolle (Kontrolle = $11,7 \pm 0,6$ amol/ml; rhAPC 5µg/ml = $12,9 \pm 0,6$ amol/ml; $p < 0,01$). Durch eine Dosissteigerung des rhAPC auf 10µg/ml ließ sich die COX-2-mRNA-Expression gegenüber der Kontrolle weiter erhöhen (Kontrolle = $11,7 \pm 0,6$ amol/ml; rhAPC 10µg/ml = $17,5 \pm 0,9$ amol/ml; $p < 0,001$). Eine weitere Zunahme der rhAPC-Konzentration auf 20µg/ml bewirkte im Vergleich zur rhAPC-Konzentration von 10µg/ml keine weitere Steigerung der COX-2-mRNA-Expression.

Der direkte Thrombininhibitor Lepirudin (5µg/ml) hatte keinen signifikanten Effekt auf die rhAPC-induzierte Steigerung der COX-2-mRNA-Expression, so dass eine Thrombinkontamination der rhAPC-Präparation ausgeschlossen werden konnte.

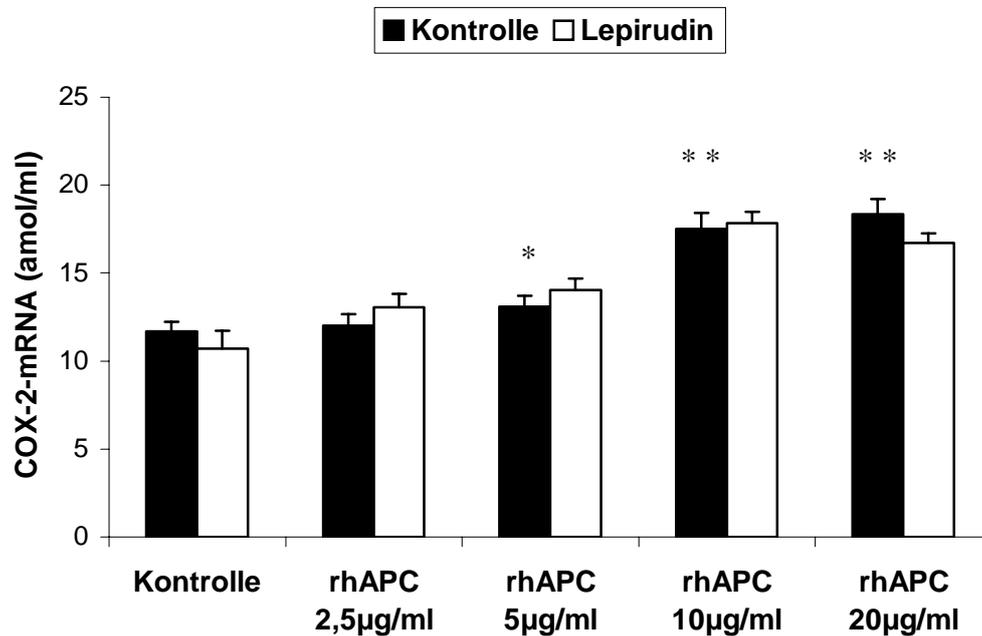


Abbildung 3-10: Dosisabhängige Steigerung der COX-2-mRNA-Expression durch rhAPC.

HUVEC wurden für 7 Stunden mit rhAPC (2,5 – 20µg/ml) inkubiert und die COX-2-mRNA-Konzentration im Zelllysate mittels eines colorimetrischen mRNA-Quantifizierungs-Assays bestimmt. Lepirudin zeigte keinen signifikanten Effekt auf die rhAPC-induzierte Steigerung der COX-2-mRNA-Expression. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus vier repräsentativen Experimenten mit jeweils 5 bzw. 6 Einzelmesspunkten. * $p < 0,01$ versus Kontrolle; ** $p < 0,001$ versus Kontrolle.

3.5.1.2. Zeitabhängigkeit

Im Weiteren wurde der Zeitverlauf der rhAPC-induzierten Steigerung der COX-2-mRNA-Expression untersucht. Die COX-2-mRNA-Konzentration im Zelllysate wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mit Hilfe eines colorimetrischen mRNA-Quantifizierungsassays bestimmt (Abb. 3-11). Auch bei diesem Experiment wurde den Zellen Lepirudin zugefügt.

Ab einer Inkubationszeit von 6 Stunden ließ sich ein signifikanter Anstieg der COX-2-mRNA-Expression gegenüber den Kontrollen nachweisen (Kontrolle = $6,5 \pm 1,3$ amol/ml; rhAPC $10\mu\text{g/ml} = 14,7 \pm 4,2$ amol/ml; $*p < 0,01$). Dieser Effekt war auch nach 9-stündiger Inkubation nachweisbar (Kontrolle = $6,5 \pm 2,0$ amol/ml; rhAPC $10\mu\text{g/ml} = 13,4 \pm 1,5$ amol/ml; $*p < 0,01$). Am Ende des Untersuchungszeitraums von 24 Stunden näherten sich die COX-2-mRNA-Werte der mit rhAPC behandelten Zellen wieder dem Niveau der Werte von unbehandelten Kontrollen (Kontrolle = $4,8 \pm 1,5$ amol/ml; rhAPC $10\mu\text{g/ml} = 5,4 \pm 0,9$ amol/ml; Unterschied: nicht signifikant).

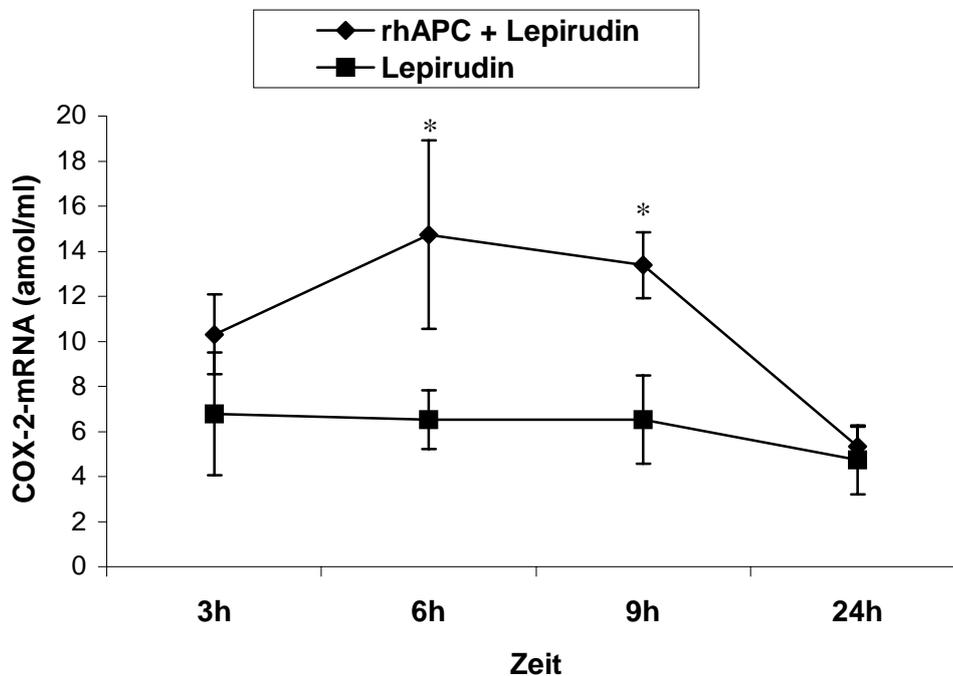


Abbildung 3-11: Wirkung von rhAPC auf die COX-2-mRNA-Expression im Zeitverlauf.

rhAPC bewirkt einen zeitabhängigen Anstieg der COX-2-mRNA-Konzentration im Zelllysate. HUVEC wurden mit rhAPC ($10\mu\text{g/ml}$) und Lepirudin ($5\mu\text{g/ml}$) behandelt. Das Zelllysate wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mittels colorimetrischem mRNA-Quantifizierungs-Assay auf COX-2-mRNA quantitativ untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Versuch mit 6 Einzelmesspunkten von insgesamt 4 Experimenten; $*p < 0,01$ versus nur mit Lepirudin behandelten Kontrollen.

3.5.2. Wirkung von rhAPC auf die Synthese von Cyclooxygenase-2-Protein

Um zu überprüfen, ob sich die Effekte von rhAPC auch auf Proteinebene widerspiegeln, wurde ein COX-2-Western Blot durchgeführt.

Konfluent wachsende Endothelzellen wurden für 10 Stunden mit rhAPC in verschiedenen Dosierungen inkubiert; als Kontrollen dienten unbehandelte HUVEC. In Höhe von 70 kDa zeigte sich die für die Cyclooxygenase-2 typische Bande. Durch Behandlung mit rhAPC sowohl in einer Konzentration von 50 ng/ml als auch in einer Konzentration von 1000 ng/ml wurde der Gehalt an COX-2-Protein in HUVEC gesteigert (Abb. 3-12).

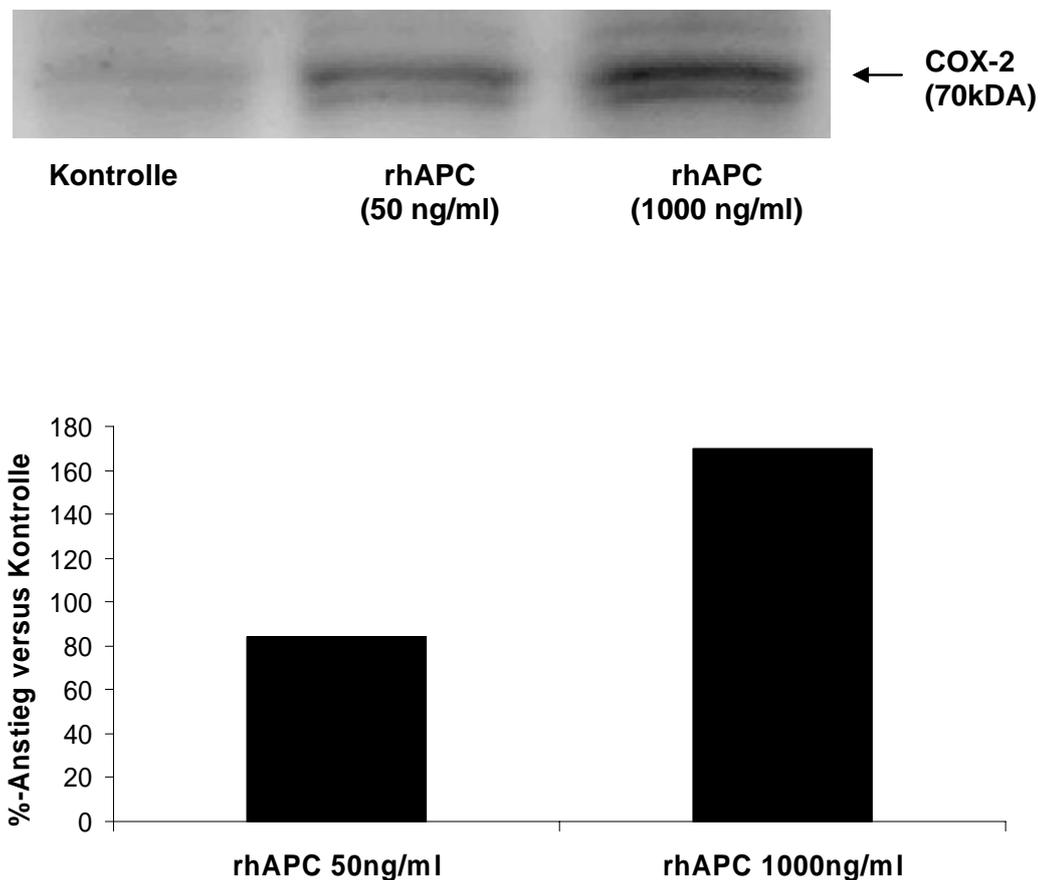


Abbildung 3-12: Einfluss von rhAPC auf die Synthese des Cyclooxygenase-2-Proteins.

Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot aus insgesamt drei vergleichbaren Experimenten. Der Gehalt an Cyclooxygenase-2-Protein in HUVEC wird durch rhAPC gesteigert. Mittels Densitometrie wurde die Cyclooxygenase-2-Bande quantifiziert.

Mittels Densitometrie wurden die Cyclooxygenase-2-Banden quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass die rhAPC-Konzentration von 50 ng/ml das Signal für COX-2 um 84% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erhöhte. Durch Stimulation mit 1000ng/ml rhAPC wurde das COX-2-Signal um 170% im Vergleich zur Kontrolle erhöht (Abb. 3-12).

3.5.3. Wirkung von rhAPC auf die 6-keto-PGF_{1α}-Freisetzung

Es wurde im folgenden Experiment der Einfluss von rhAPC auf die Freisetzung von 6-keto-PGF_{1α}, dem stabilen Abbauprodukt des Prostazyklins, in humanen Endothelzellen untersucht. Die Zellen wurden mit rhAPC stimuliert und die 6-keto-PGF_{1α}-Konzentration im Zellüberstand mittels ELISA gemessen.

Die Behandlung von humanen Endothelzellen mit rhAPC bedingte eine von der rhAPC-Konzentration abhängige Zunahme der Freisetzung von 6-keto-PGF_{1α} (Abb. 3-13). Dabei führte die Behandlung mit rhAPC ab einer Konzentration von 5µg/ml zu einer signifikanten Steigerung der 6-keto-PGF_{1α}-Freisetzung gegenüber den Kontrollen (Kontrolle = 62,5 ± 8,7amol/ml; rhAPC 5µg/ml = 132,7 ± 20,5amol/ml; *p<0,01). Durch eine Dosissteigerung des rhAPC auf 10µg/ml ließ sich die 6-keto-PGF_{1α}-Freisetzung gegenüber der Kontrolle auf das 2,5-fache erhöhen (Kontrolle = 62,5 ± 8,7amol/ml; rhAPC 10µg/ml = 151,5 ± 11,2amol/ml; *p<0,001). Eine weitere Dosissteigerung des rhAPC auf 20µg/ml ergab keine weitere Vergrößerung des Effekts gegenüber einer rhAPC-Konzentration von 10µg/ml.

Lepirudin zeigte keinen signifikanten Einfluss auf den durch rhAPC induzierten Anstieg der 6-keto-PGF_{1α}-Konzentration im Zellüberstand (Abb. 3-13), so dass eine Kontamination der rhAPC-Präparation mit Thrombin ausgeschlossen werden konnte.

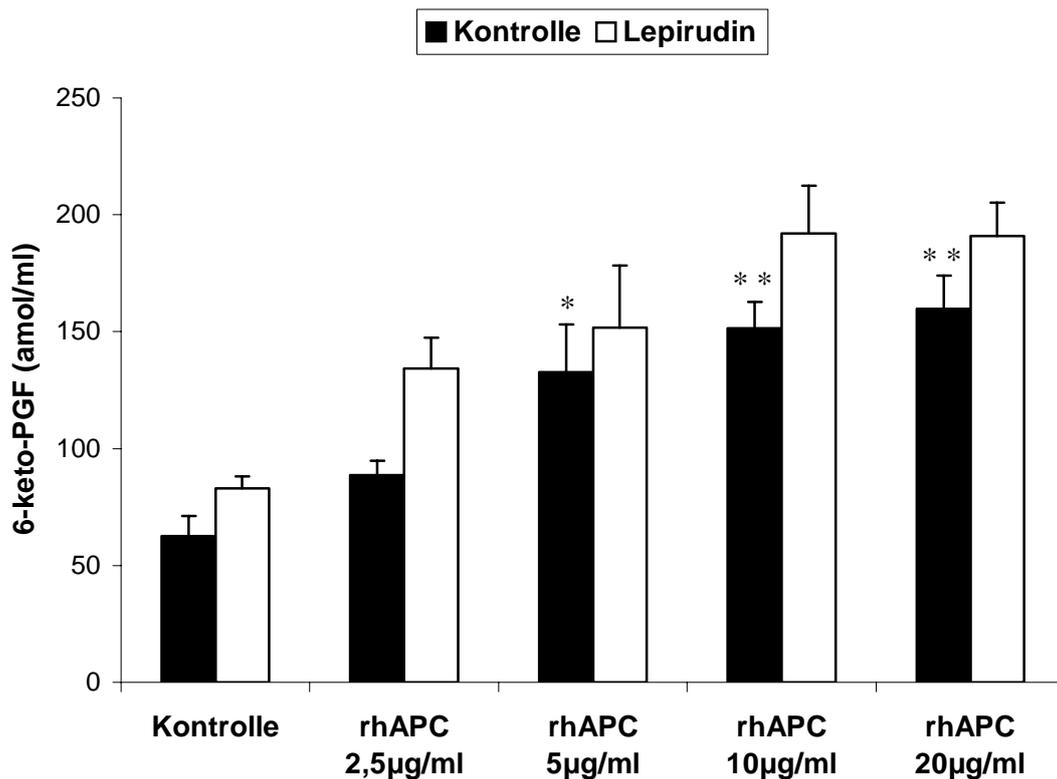


Abbildung 3-13: Dosisabhängige Steigerung der 6-keto-PGF_{1α}-Konzentration im Zellüberstand durch rhAPC

HUVEC wurden für 7 Stunden mit rhAPC (2,5 – 20µg/ml) inkubiert, danach wurden die Zellüberstände mittels ELISA auf ihren 6-keto-PGF_{1α}-Gehalt untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus drei repräsentativen Experimenten mit jeweils 6 Einzelmesspunkten (n=6); *p<0,01 versus Kontrolle; **p<0,001 versus Kontrolle.

3.5.4. Wirkung von Protein C auf die Cyclooxygenase-2-mRNA-Expression

Ziel der hier folgenden Experimente ist die Überprüfung, ob nicht aktiviertes Protein C eine Wirkung auf die COX-2-mRNA-Expression ausübt.

Dazu wurden konfluente Endothelzellen mit Protein C (80nM bzw. 160nM) für 9 Stunden inkubiert. 80nM Protein C sind äquimolar zu 5µg/ml rhAPC. Als Kontrolle wurden unbehandelte Endothelzellen eingesetzt.

Protein C zeigte im Vergleich zur Kontrolle keinen steigernden Effekt auf die COX-2-Expression (Kontrolle = $31,0 \pm 6,0$ amol/ml; Protein C 80nM = $34,2 \pm 4,3$ amol/ml; Protein C 160nM = $34,0 \pm 3,8$ amol/ml; Unterschied nicht signifikant) (Abb. 3-15).

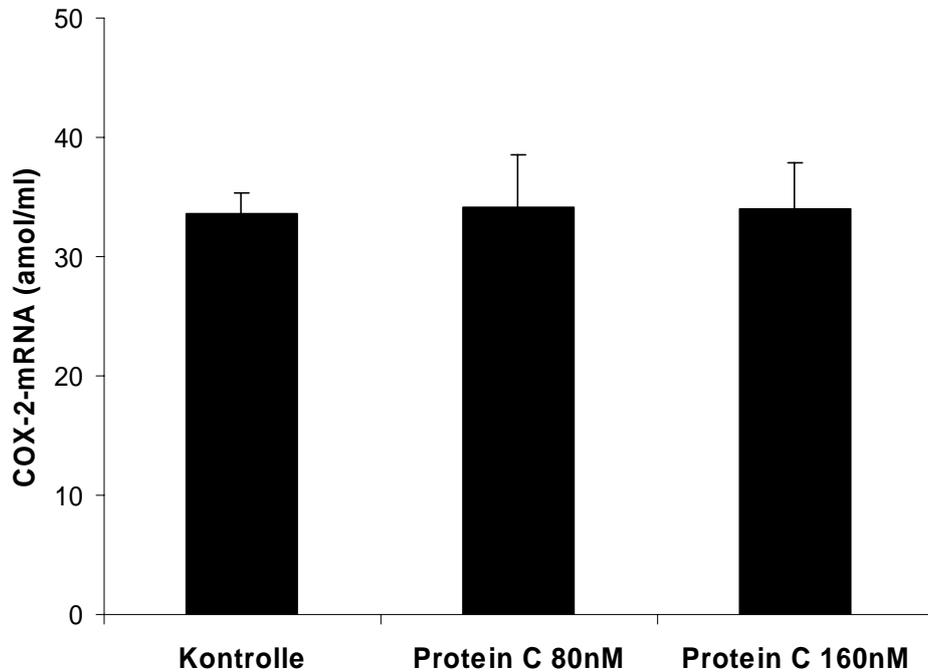


Abbildung 3-15: Wirkung von Protein C auf die COX-2-Expression. Endothelzellen wurden für 9 Stunden mit Protein C inkubiert. Das Zelllysate wurde mit einem colorimetrischen mRNA-Quantifizierungs-Assay auf COX-2-mRNA quantitativ untersucht. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Ergebnissen mit jeweils 6 Einzelmesspunkten. Es sind die Mittelwerte \pm SD angegeben.

3.5.5. Wirkung von Protein C auf die 6-keto-PGF_{1α}-Freisetzung

Zur Bestätigung des Ergebnisses aus Abschnitt 3.5.4. wurde aus dem Zellüberstand desselben Versuches die Konzentration des 6-keto-PGF_{1α} gemessen.

Auch hier war keine signifikante Steigerung der 6-keto-PGF_{1α}-Konzentration durch die Protein C-Behandlung messbar (Kontrolle = $76,5 \pm 12,6$ amol/ml; Protein C 80nM = $95,8 \pm 16,3$ amol/ml; Protein C 160nM = $89,3 \pm 22,0$ amol/ml; Unterschied nicht signifikant).

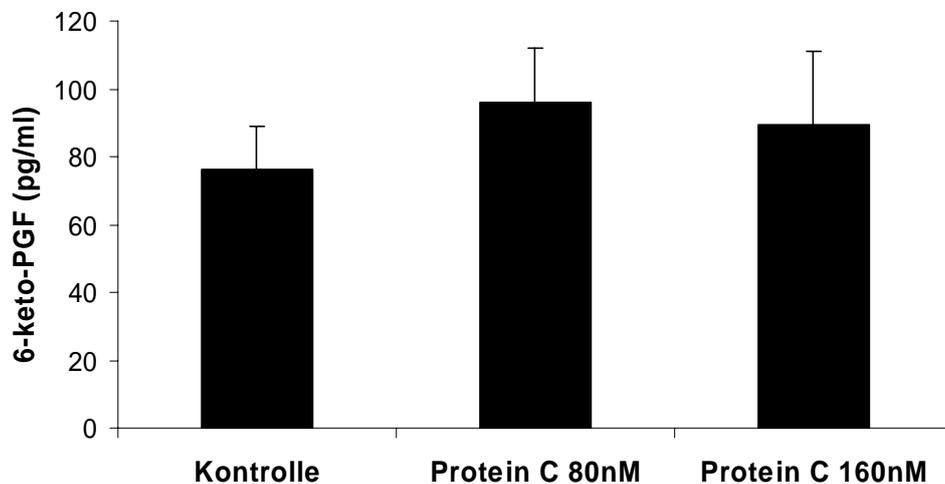


Abbildung 3-16: Wirkung von Protein C auf die 6-keto-PGF_{1α}-Freisetzung.

Endothelzellen wurden für 9 Stunden mit Protein C inkubiert. Der Zellüberstand wurde mit einem Elisa auf die 6-keto-PGF_{1α}-Konzentration untersucht. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Ergebnissen mit jeweils 6 Einzelmesspunkten. Es sind die Mittelwerte \pm SD dargestellt.

3.5.6. Wirkung von Protein C und APC auf die Cyclooxygenase-1-Expression

In den anschliessenden Experimenten wurde die Wirkung von rhAPC und Protein C auf die COX-1-Expression untersucht.

Hierfür wurden Endothelzellen mit Protein C (80nM oder 160nM) und rhAPC (5µg/ml oder 10µg/ml; = äquimolare Dosen) behandelt. Nach 9 Stunden Inkubationszeit wurde aus dem Zelllysate die COX-1-mRNA-Konzentration gemessen.

Weder die Behandlung mit Protein C noch die mit rhAPC zeigte eine Steigerung der COX-1-Expression (Abb. 3-17). Es konnte tendenziell eine Hemmung durch die Behandlung mit Protein C (80nM) vermerkt werden (Kontrolle = $5,2 \pm 0,7$ pg/ml; Protein C = $3,0 \pm 1,6$ pg/ml; * $p < 0,05$). Auch rhAPC in einer Dosierung von 10µg/ml bewirkte eine leichte Hemmung der COX-1-Expression (Kontrolle = $5,2 \pm 0,7$ pg/ml; rhAPC = $2,1 \pm 1,2$ pg/ml; ** $p < 0,001$).

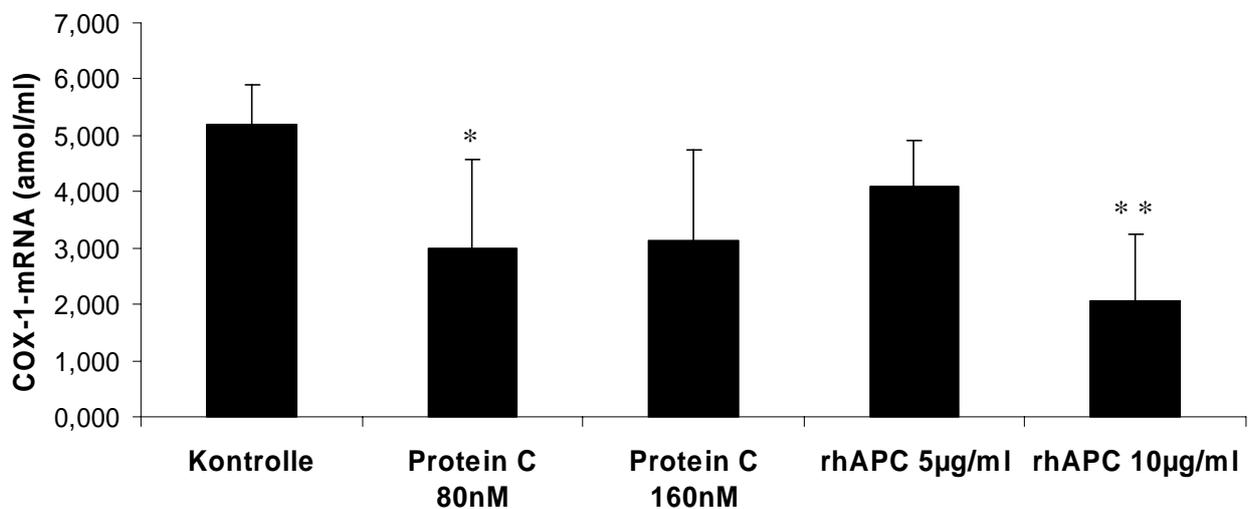


Abbildung 3-17: Wirkung von Protein C und rhAPC auf die COX 1-Expression

Endothelzellen wurden mit Protein C (80nM bzw. 160nM) und rhAPC (5µg/ml bzw. 10µg/ml) für 9 Stunden inkubiert. COX-1-mRNA wurde aus dem Zelllysate mittels colorimetrischem mRNA-Quantifizierungs-Assay gemessen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm SD eines repräsentativen Ergebnisses mit 6 Einzelmesspunkten; * $p < 0,05$ versus Kontrolle, ** $p < 0,001$ versus Kontrolle.

3.5.7. Wirkung von NS-398 auf die 6-keto-PGF_{1α}-Freisetzung

Um zu untersuchen, ob rhAPC über die Steigerung der COX-2-Expression die 6-keto-PGF_{1α}-Freisetzung steigert, wurde ein selektiver COX-2-Inhibitor (NS-398) eingesetzt.

Endothelzellen wurden für 8 Stunden mit NS-398 (1μM) und rhAPC (10μg/ml) inkubiert. Der COX-2-Inhibitor wurde dabei 30 Minuten vor rhAPC zu den Zellen gegeben. Der 6-keto-PGF_{1α}-Gehalt im Zellüberstand wurde mittels Elisa gemessen.

Der durch rhAPC-induzierte signifikante Anstieg von 6-keto-PGF_{1α} (Kontrolle = 67,6 ± 12,1 pg/ml; rhAPC = 99,0 ± 11,0 pg/ml; p<0,05) konnte durch gleichzeitige Inkubation mit NS-398 signifikant gehemmt werden (rhAPC = 99,0 ± 11,0 pg/ml; rhAPC + NS-398 = 61,5 ± 21,8 pg/ml; *p<0,05).

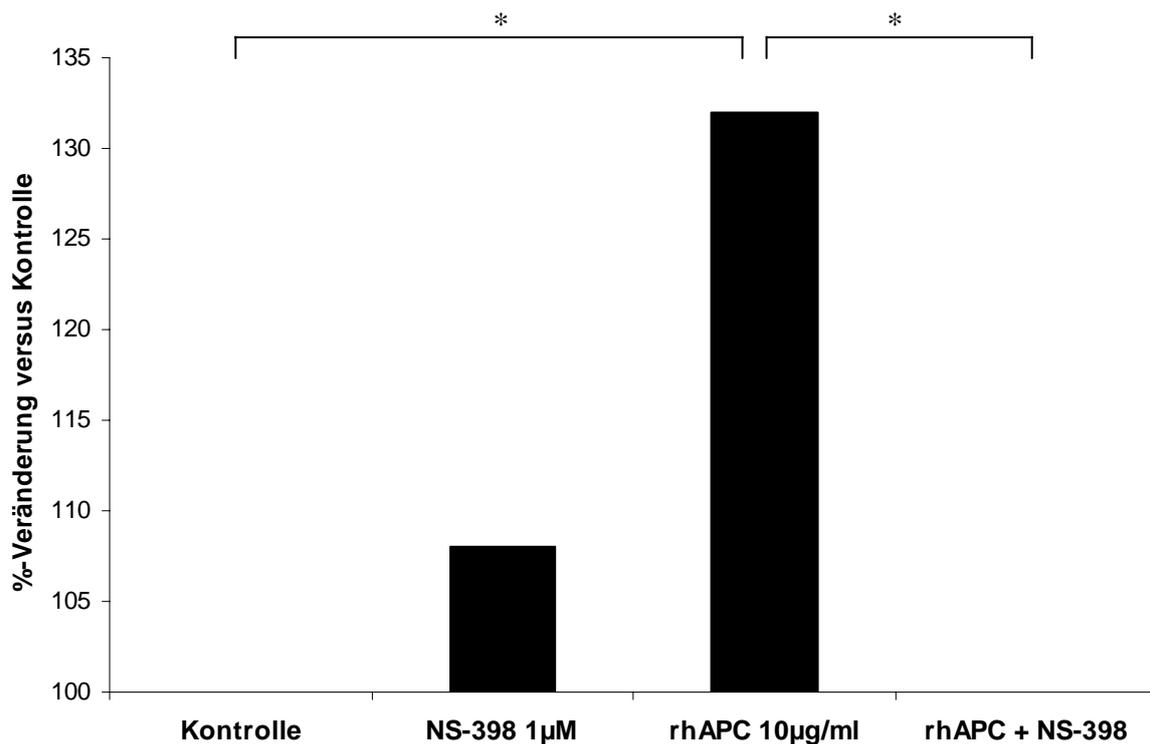


Abbildung 3-18: Wirkung von NS-398 auf die 6-keto-PGF_{1α}-Freisetzung.

NS-398 hemmt signifikant die durch rhAPC-induzierte Steigerung der 6-keto-PGF_{1α}-Konzentration. Die Abbildung zeigt die prozentuale Veränderung gegenüber der Kontrolle.

3.5.8. Wirkung von Prostaglandin H₂ auf die 6-keto-PGF_{1α}-Freisetzung

In folgenden Experimenten wurde der Effekt von Prostaglandin H₂ (PGH₂), dem Substrat der Prostaglandin-I₂-Synthase (PGIS), auf die 6-keto-PGF_{1α}-Freisetzung untersucht. Damit sollte der Einfluss von rhAPC auf die PGIS untersucht werden. PGIS wandelt Prostaglandin H₂ in Prostacyclin (PGI₂) um.

Zu diesem Zweck wurden Endothelzellen mit PGH₂ und rhAPC für 8 Stunden inkubiert. PGH₂ wurde 30 Minuten vor rhAPC den Endothelzellen zugefügt. Nach Ablauf der 8-stündigen Inkubationszeit konnte mit Hilfe eines Elisas die 6-keto-PGF_{1α}-Konzentration im Zellüberstand gemessen werden.

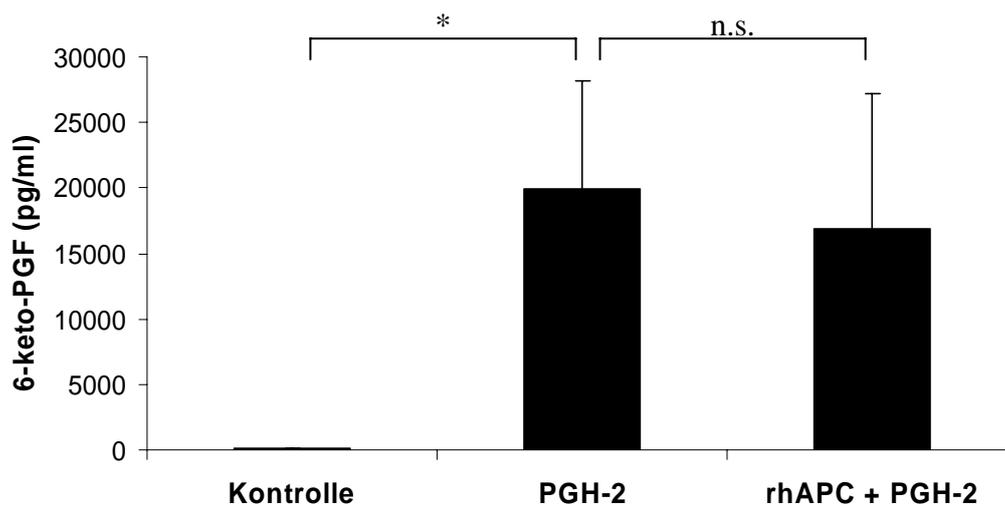


Abbildung 3-19: Wirkung von PGH₂ auf die 6-keto-PGF_{1α}-Freisetzung.

Endothelzellen wurden für 8 Stunden mit PGH₂ (20μM) bzw. rhAPC (10μg/ml) + PGH₂ (20μM) inkubiert. Aus dem Zellüberstand wurde mittels Elisa die 6-keto-PGF_{1α}-Konzentration gemessen. Es sind die Mittelwerte ± SD eines repräsentativen Ergebnisses von insgesamt zwei Experimenten mit jeweils 6 Einzelmesspunkten dargestellt; *p<0,001.

Endothelzellen, die mit PGH₂ behandelt waren, setzten signifikant mehr 6-keto-PGF_{1α} frei als die unbehandelten Kontrollen (Kontrolle = 67,6 ± 12,1 pg/ml; PGH₂ = 19934 ± 8282 pg/ml; *p<0,001). Durch die Behandlung von PGH₂ und rhAPC konnte kein weiterer Anstieg der 6-keto-PGF_{1α}-Freisetzung gegenüber der Behandlung mit PGH₂ festgestellt werden (PGH₂ = 19934 ± 8282 pg/ml; rhAPC + PGH₂ = 16940 ± 10210 pg/ml; n.s.). Ein stimulierender Einfluss von rhAPC auf die PGIS konnte somit ausgeschlossen werden.

Kapitel 4: Diskussion

4.1. Anmerkungen zur Zellvitalität

Die Vitalität der Endothelzellen wurde am Ende der Experimente mittels mikroskopischer Untersuchung und mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Die Vitalität betrug > 90%, wodurch gezeigt werden konnte, dass die durchgeführten Experimente an einem intakten Zellverband stattfanden.

4.2. Affymetrix® GeneChip Array

Der Affymetrix® GeneChip Array ermöglichte umfassend die Untersuchung der endothelialen Genexpressionen in Gegenwart und Abwesenheit von rhAPC. Dieses Screening-Verfahren ist eine semiquantitative Möglichkeit, die Genexpression von ca. 38500 Genen gleichzeitig zu erfassen. Diese Methode der umfangreichen Charakterisierung der Genexpression kann aber als Aussage für eine signifikante Steigerung oder Hemmung der Genexpression nicht allein herangezogen werden. Der Array kann lediglich als Screening-Untersuchung für markante Genprodukte verwendet werden, zu denen im Kontext dieser Arbeit vor allen Chemokine, Wachstumsfaktoren, Zytokine und zytokinverwandte Proteine und deren Rezeptoren zählten. Mittels dieser Untersuchung kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob im Falle der identifizierten Gene die Gentranskription selbst oder aber posttranskriptionelle Mechanismen durch rhAPC beeinflusst werden, da die Methode des Gen-Arrays nur die „*steady-state*-Konzentration“ der mRNA erfasst. Diese wird beeinflusst zum einen von der Syntheserate und zum anderen von der Synthese-Stabilität und der Abbaurate der mRNA. Die mittels des Genarrays gewonnenen Resultate wurden daher in den nachfolgend beschriebenen Ergebnissen zusätzlich mittels quantitativer Methoden wie ELISA und colorimetrischen mRNA-Quantifizierungs-Assays und mittels semiquantitativer Untersuchungen wie reverse-transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion und Western-Blot

bestätigt. Darüberhinaus wurden die beteiligten Mechanismen, d.h. Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren, näher untersucht.

Tabelle 3-1 zeigt eine Auswahl dieser Genprodukte, auf deren mRNA-Expression die Behandlung mit rhAPC einen messbaren Einfluss ausübte. Aus diesem Pool interessanter Genprodukte wurden das Chemokin Fractalkine, der Wachstumsfaktor Transforming Growth Factor- β 2 und das Enzym Cyclooxygenase-2 zur näheren Untersuchung und Bestätigung ausgewählt.

Der Affymetrix-Array als Screening-Untersuchung wurde bereits früher zur Untersuchung von APC-Wirkmechanismen eingesetzt. (Joyce DE et al. 2001; Riewald M et al. 2005). Im Vergleich zu unseren Untersuchungen werden sowohl vergleichbare als auch gegensätzliche Ergebnisse von diesen Autoren beschrieben. Joyce et al. (2001) berichteten über eine Hemmung der Expression von E-Selektin, VCAM-1, ICAM-1 und Fractalkine. Wir hingegen beobachteten einen Anstieg der Expression von E-Selektin, VCAM-1, ICAM-1 und Fractalkine. Riewald et al. 2005 zeigten in einer kleinen Auswahl ihrer Affymetrix-Daten Gemeinsamkeiten zu unseren Resultaten: In dieser Publikation wird die teilweise gleichsinnige Genregulation von APC und Thrombin auf diverse Gene, wie z.B. COX-2, die wir ebenso feststellen konnten, dargestellt. Die Unterschiede zwischen früher veröffentlichten Ergebnissen und unseren Daten könnte durch zahlreiche Faktoren (unterschiedliche Inkubationszeiten und Konzentrationen, Zusätzliche Gabe von TNF- α zu den rhAPC-behandelten Endothelzellen, etc.) zustande gekommen sein.

4.3. Fractalkine

Unsere Ergebnisse zeigen, dass rhAPC die endotheliale Fractalkine-mRNA-Expression und die Freisetzung des Fractalkine-Proteins zeit- und dosisabhängig steigert. Ein deutlicher Effekt wurde jedoch nur bei suprapharmakologischen Dosierungen ($> 5\mu\text{g/ml}$) beobachtet, wie auch im Affymetrix GeneChip Expressions Array (Abschnitt 3.2.). Physiologische (50ng/ml) APC-Konzentrationen zeigten keinen Effekt. Bereits im Affymetrix-Genarray war eine verstärkte Genexpression von Fractalkine unter dem Einfluss von rhAPC nachgewiesen worden. Diese Genarray-Befunde standen im Einklang zu den anschließend durchgeführten Messungen von löslichem Fractalkine im Zellüberstand von Endothelzellen.

Diese *in-vitro* Ergebnisse zeigen einen weiteren Wirkmechanismus von rhAPC, der möglicherweise *in vivo* bedeutsam sein könnte für die Regulation der Chemotaxis und Adhäsion im Rahmen einer schweren Sepsis. Fractalkine bewirkt die Migration natürlicher Killerzellen (NK) und cytotoxischer T-Lymphozyten sowie die Produktion von Interferon- γ (Umehara et al. 2004). Die positive Wirkung von Fractalkine wurde auch in erkranktem periodontalem Gewebe mittels rt-PCR festgestellt. Eine erhöhte Freisetzung des Chemokins Fractalkine aus Endothelzellen wurde durch uns beobachtet. Eine zusätzliche Infiltration an natürlichen Killerzellen (NK) in das Gewebe lässt vermuten, dass Fractalkine die Migration von verschiedenen inflammatorischen Zellen, einschliesslich T-Helfer-Zellen 1 (Th1), NK-Zellen und Makrophagen, kontrolliert (Hosokawa Y et al. 2005).

In zahlreichen Publikationen wird eine Steigerung der Fractalkine-Expression durch inflammatorische Stimuli beschrieben (Bazan JF et al. 1997; Insaizumi T et al. 2000; Garcia GE et al. 2000; Fraticelli P et al. 2001; Beck GCh et al. 2003; Hosokawa Y et al. 2005). Die gesteigerte Fractalkine-Expression durch proinflammatorische Stimuli wird in Zusammenhang mit der Aktivierung von natürlichen Killerzellen, Makrophagen und T-Helfer-Zellen gesehen. Es kann vermutet werden, dass rhAPC durch Steigerung der Fractalkine-Freisetzung aus Endothelzellen die Chemotaxis auf weiße Blutzellen und damit die lokale Abwehr steigert und dadurch die Immunantwort positiv beeinflusst.

Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Steigerung der Fractalkine-Freisetzung spezifisch für die Behandlung mit rhAPC ist. Der Einsatz von Protein C bewirkte keine signifikante Steigerung der Fractalkine-Freisetzung aus Endothelzellen. Nach 30 Stunden

Inkubationszeit konnte nur bei den rhAPC-behandelten Zellen eine signifikante Fractalkine-Freisetzung dokumentiert werden. Die Ursache dafür liegt möglicherweise bei dem EPCR, der zwar APC und auch Protein C binden, aber nur APC und nicht Protein C in den Zellkern transportieren kann. Dadurch werden verschiedene Gene durch rhAPC hoch- oder runterreguliert, aber Protein C kann keinen Einfluss auf die Genexpression ausüben.

Unsere Untersuchungen zu den beteiligten Rezeptoren zeigen, dass APC die Steigerung von Fractalkine über den PAR-1-Rezeptor bewirkt. PAR-1 wurde als Co-Rezeptor für den EPCR in der Literatur beschrieben. Über EPCR und PAR-1 wirkt APC antiinflammatorisch (Riewald M et al. 2002), antiapoptotisch (Mosnier LO et al. 2003) und neuroprotektiv (Cheng T et al. 2003; Guo H et al. 2004). Riewald et al. (2002) berichten über eine Co-Aktivierung des PAR-1 über den APC-EPCR-Komplex. Dies konnte in eigenen früheren Untersuchungen bestätigt werden (Brückmann et al. 2005). Die Stimulierung des Rezeptors mit einem Agonisten konnte bei einer Konzentration von 100µM eine signifikante Steigerung der Fractalkine-Freisetzung hervorrufen. Ebenso zeigte die Hemmung des Rezeptors mit einem Antagonisten eine signifikante Inhibition der rhAPC-induzierten Fractalkine-Freisetzung. Daher kann von einer Beteiligung des PAR-1-Rezeptors bei der rhAPC-induzierten Steigerung der Fractalkine-Freisetzung ausgegangen werden.

Der positive Effekt, den APC über den PAR-1 ausübt wurde bereits an einem Mausmodell untersucht: in diesem Modell wurde bei Mäusen eine cerebrale Ischämie induziert. Durch gleichzeitige rhAPC-Behandlung konnte ein protektiver Effekt erzielt werden. Mäuse, die hingegen unter Einfluss eines PAR-1-Antagonisten standen oder bei denen das PAR-1-Gen ausgeschaltet (sog. *Knock-out*-Mäuse) wurde, zeigten diesen Effekt nicht (Cheng T et al. 2003; Guo H et al. 2004).

Es ist noch nicht genau bekannt, warum sowohl die antiinflammatorischen Effekte des APC als auch proinflammatorische Wirkungen von Thrombin über denselben Rezeptor PAR-1 laufen. Es wird vermutet, dass unterschiedliche Konzentrationen von APC bzw. von Thrombin und eine eventuelle Beteiligung von Sphingosin-Kinase-1 und S1P1 die Ursache für unterschiedliche Effekte des PAR-1 verantwortlich sind. Eine hohe Thrombinkonzentration zum Beispiel wird als Auslöser der Endothelzellzerstörung gesehen. Hingegen scheinen eine niedrige Thrombinkonzentration oder APC in Verbindung mit dem S1P1-Weg dem Schutz der Endothelzellbarriere zu dienen (Freistritzer C et al. 2005). Noch

nicht bekannte intrazelluläre Wege, die vom PAR-1-Rezeptor ausgehen, könnten für die unterschiedlich starke Fractalkine-Freisetzung durch APC und Thrombin verantwortlich sein. So könnte eine niedrige Fractalkine-Freisetzung durch rhAPC zu einer lokalen Immunantwort führen, aber keine systemische Inflammation verursachen, wobei die durch Thrombin-induzierte gesteigerte übermäßige Fractalkine-Freisetzung zur Aktivierung von Leukozyten, systemischer Inflammation und Gefäßschädigung führen kann. Die vielfach gewonnene Erkenntnis, dass Thrombin einen größeren Effekt als APC erzielt (Parry MA et al. 1996; Kuliopulos A et al. 1999; Altrogge LM et al. 2000; Mosnier LO et al. 2004; Ludeman MJ et al. 2005), konnte durch unsere Versuche bestätigt werden. Vermutlich geschieht dieses durch die Aktivierung weiterer Protease-aktivierbarer-Rezeptoren durch Thrombin (z.B. PAR-3/-4). Eine Aktivierung des PAR-2 durch APC konnte in eigenen Studien über die COX-2 (Daten nicht gezeigt) und zu Fractalkine (Daten nicht gezeigt) nicht erzeugt werden. Auch die APC-induzierte Fractalkine-Freisetzung wurde durch Einsatz eines PAR-2-Antagonisten nicht signifikant gehemmt. Damit ist die Aussage, dass APC über eine alleinige Aktivierung von PAR-1 protektive Wirkungen entfaltet, bestätigt (Riewald M et al. 2002).

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen berichteten Joyce et al. (2001) über eine Hemmung der Fractalkine-Expression durch rhAPC-Behandlung bei HUVEC. Zudem wurden die Gene von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin in ihrer Expression gehemmt, wohingegen wir Steigerungen dieser Gene im Affymetrix-Array beobachteten. Im Unterschied zu unseren Versuchsansätzen wurden jedoch die Endothelzellen bei Joyce et al. (2001) zusätzlich mit TNF- α für 7 Stunden inkubiert. In der Publikation von Ludeman et al. (2005) wird in Übereinstimmung zu unseren Resultaten eine gesteigerte Gen-Expression des Chemokins Fractalkine durch APC-Behandlung von HUVEC beschrieben.

Unsere Ergebnisse können zu einem besseren Verständnis der APC-Wirkungsweise *in vivo* beitragen. Bisher konnte in klinischen Studien nur der antithrombotische Effekt gemessen werden. Die antiinflammatorische Wirkung, die vielfach *in vitro* gemessen werden konnte, wurde *in vivo* noch nicht nachgewiesen. Dieser Unterschied von *in vitro*- und *in vivo*-Ergebnissen resultiert vermutlich aus den unterschiedlich eingesetzten Konzentrationen von rhAPC. In den *in vitro* Versuchsreihen konnte nur mit suprapharmakologischen Dosierungen

ein antiinflammatorischer Effekt erzielt werden. In klinischen Studien wurde hingegen mit einer Konzentration von 24µg/kg/h gearbeitet, welches einem rhAPC-Blutspiegel von im Median 45ng/ml entspricht. Eine höhere Dosierung des rhAPC bei Patienten ist aufgrund der antithrombotischen Wirkung und möglicher Blutungskomplikationen nicht möglich. Obwohl die Übertragbarkeit von Resultaten der *in vitro*-Studien nicht ohne weiteres auf klinische Studien möglich ist, so sind Zellkulturuntersuchungen dennoch unerlässlich, um erste Hinweise auf die molekularen Wirkmechanismen einer Substanz zu bekommen.

4.4. Transforming Growth Factor- β 2

Die in Abschnitt 3.4. dargestellten Ergebnisse stellen einen eventuell weiteren Wirkmechanismus von rhAPC in der schweren Sepsis dar. Es konnte gezeigt werden, dass rhAPC in physiologischen bis suprapharmakologischen Dosierungen (50ng/ml – 50 μ g/ml) eine vermehrte Expression des TGF- β 2-Gens und zu einer gesteigerten Freisetzung des TGF- β 2-Proteins gegenüber unbehandelten Kontrollen führt. Damit ist die Aussage des Affymetrix-Genarrays sowohl auf mRNA-Ebene als auch Protein-Ebene bestätigt worden. Bei den Ergebnissen aus den Immunoassays ist allerdings zu berücksichtigen, dass nur ab einer Konzentration von 5 μ g/ml rhAPC und einer Inkubationszeit von 9 Stunden eine signifikante Steigerung der TGF- β 2-Freisetzung protokolliert werden konnte. Eine kürzere Inkubationszeit oder/und niedrige rhAPC-Konzentrationen führten zu keinem signifikanten Ergebnis. Die Ergebnisse sind aufgrund der Sensitivität des TGF- β -Immunoassays vorsichtig zu betrachten. Möglicherweise war die Sensitivität des Immunoassays nicht groß genug, um Unterschiede in der TGF- β -Konzentration nach Stimulation mit niedrigen rhAPC-Dosierungen (<5 μ g/ml) zu detektieren.

Riewald et al. (2005) zeigen in ihrem Genarray-Profil eine gesteigerte TGF- β -Expression von Endothelzellen, die mit TNF- α oder Thrombin behandelt wurden. Eigene Untersuchungen der TGF- β 2-mRNA-Expression bei Endothelzellen unter dem Einfluss von Thrombin zeigten den gleichen Effekt. Erstmals konnte hier gezeigt werden, dass APC ähnlich wie Thrombin die TGF- β -Expression steigert. Eine gesteigerte TGF- β 2-mRNA-Konzentration durch APC-Gabe ist in früheren Genarray-Untersuchungen (Riewald M et al. 2005) bisher nicht dokumentiert worden.

Dem TGF- β 2 werden einige antiinflammatorische Effekte zugesprochen, die eventuell durch APC stimuliert werden (Robak T 1995, Graham MF et al. 1990; Dignass AU et al. 1993; Flisiak R et al. 2000). TGF- β 2 wird eine Bedeutung in Zusammenhang mit der Regeneration erkrankter Gewebe und Organe, der Remodellierung von Knochen, aber auch bei Neoplasien und Fibrosen im Zuge chronischer inflammatorischer Erkrankungen zugeschrieben. Zudem verhindert TGF- β 2 eine überschießende proinflammatorische Wirkung durch Hemmung der Leukozytenadhäsion und -transmigration durch das Endothel. Dieser Effekt entsteht unter anderem durch die Reduzierung der IL-8-Synthese und der E-Selektin-Expression

(Pintavorn P et al. 1997). In einem Mausmodell über Multiple Sclerose verhindert die TGF- β 2-Gabe die T-Lymphozyten-Akkumulation (Santambrogio L et al. 1993). In eigenen früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass durch APC die Freisetzung des Platelet-derived-growth-factor-BB (PDGF-BB), ein wichtiger antiinflammatorischer Faktor, gesteigert wird. Es ist bekannt, dass auch TGF- β 2 die Expression dieses Wachstumsfaktors im Endothel steigert.

In Abschnitt 1.2.4. wurde bereits auf die antiapoptotische Wirkung von APC eingegangen. In einer Publikation von Lu et al. (2004) wird eine NF- κ B abhängige antiapoptotische Wirkung von TGF- β 2 beschrieben. In Prostatakrebszellen ist der TGF- β 2-NF- κ B-Weg für die Vitalität des Tumors wichtig. Es ist daher zu vermuten, dass APC möglicherweise über die Induktion des TGF- β -Wegs antiapoptotisch wirksam ist.

Wie zuvor bereits angesprochen (siehe Abschnitt 4.3.), ist die Übertragbarkeit von Resultaten von *in vitro*-Untersuchungen auf *in vivo*-Bedingungen häufig schwierig. Auch im Falle von TGF- β 2 sollte die klinische Bedeutung der hier beschriebenen und diskutierten eigenen Resultate kritisch betrachtet werden.

4.5. Cyclooxygenase-2

Im Abschnitt 3.5. konnte gezeigt werden, dass rhAPC die COX-2-mRNA-Expression sowie die Expression von COX-2-Protein in humanen Endothelzellen (HUVEC) dosis- und zeitabhängig steigert. Die Wirkung von APC *in vitro* war wiederum nur in suprapharmakologischer Konzentration (5µg/ml) zu beobachten. Dies entspricht den bisherigen Ergebnissen von APC in Zusammenhang mit vielen anderen durch APC modulierten Genprodukten, wie z.B. auch Fractalkine und TGF-β2. Die erhöhte COX-2-mRNA-Konzentration unter rhAPC-Einfluss könnte auch durch die Stabilisierung und Akkumulation von COX-2-mRNA zustande gekommen sein. Bereits frühere Untersuchungen konnten zeigen, dass APC einen Einfluss auf die mRNA-Stabilität von Zytokinen und Chemokinen hat (Brueckmann et al. 2003). Eine Kontamination der rhAPC-Präparation mit Thrombin konnte ausgeschlossen werden, wie Versuche mit dem direkten Thrombinantagonisten Lepirudin zeigten. Die Ergebnisse aus dem Affymetrix Genarray wurden damit mit weiteren Methoden zum mRNA- und Proteinnachweis bestätigt.

Der erhöhte endotheliale COX-2-Proteingehalt bedingte zudem eine verstärkte Freisetzung von Prostacyclin (PGI₂) bzw. seinem stabilen Hydrolyseprodukt 6-keto-PGF_{1α}. Unser Modell beinhaltet menschliche Endothelzellen, die über COX-2 vor allem für die Produktion von Prostazyklin verantwortlich sind. Prostazyklin werden zytoprotektive und antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben (Abbildung 4-1). *In vivo* werden allerdings komplexe Verhältnisse vorgefunden, so dass ein systemisch positiver Einfluss von APC auf COX-2 im Rahmen des Sepsisgeschehens durch unsere Versuche nicht bewiesen ist. Weitere *in vivo*-Studien werden benötigt, um diese Fragestellung zu klären.

Die Steigerung von PGI₂ durch APC könnte eine wichtige Rolle bei der Therapie der Mikrozirkulationsstörung und des Organversagens im Rahmen der schweren Sepsis spielen. So weisen bereits früher durchgeführte Versuche an Tieren auf eine zytoprotektive Wirkung von PGI₂ im Bezug auf die Funktion von Lunge, Leber und Niere hin (Scheeren T et al. 1997; Harbrecht BG et al. 1994). Unklar ist jedoch, ob diese Zytoprotektion auf einer verbesserten Organperfusion infolge Vasodilatation beruht oder auf eine regionale Reduktion von TNF-α und/oder Sauerstoffradikalen durch Prostazyklin zurückzuführen ist (Scheeren T et al. 1997).

Die im Sepsisgeschehen möglichen positiven Effekte von Prostacyclin und der Einfluss von APC auf den Prostacyclin-Spiegel sind in der Abbildung 4-1 zusammengefasst.

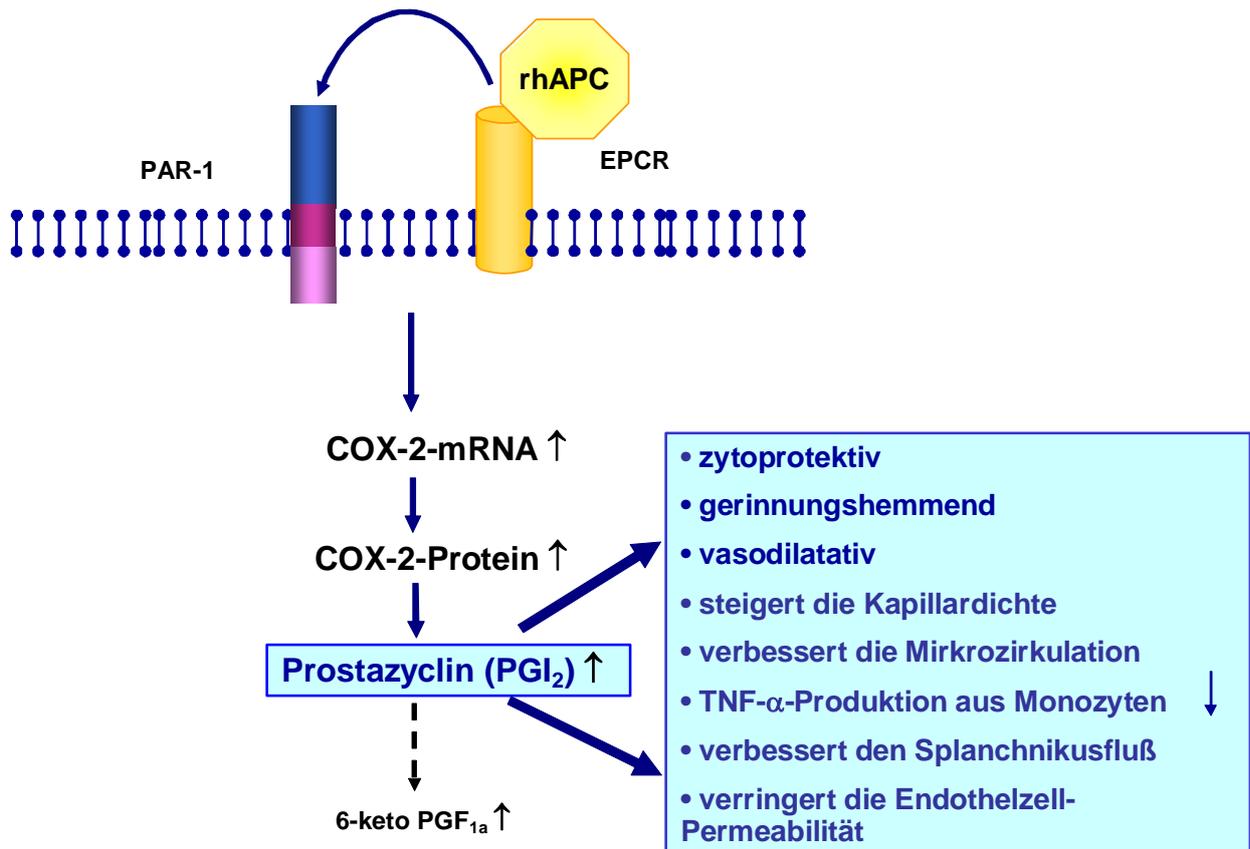


Abbildung 4-1: Wirkung von APC auf die Expression von COX-2 und die Freisetzung von PGI₂

Protein C konnte in äquimolarer Konzentration in Bezug auf die COX-2-mRNA-Expression und 6-keto-PGF_{1α}-Freisetzung bei HUVEC keine signifikanten Effekte hervorrufen.

Offensichtlich kann Protein C ähnlich wie APC zwar an den endothelialen Protein C-Rezeptor binden, Protein C wird jedoch im Gegensatz zu APC nicht in den Zellkern transportiert und hat demzufolge keine Effekte auf die Gentranskription in HUVEC.

In unseren Untersuchungen wurde zudem festgestellt, dass rhAPC eine alleinige Wirkung auf die Expression von COX-2, und nicht auch auf die konstitutive COX-1, hat. In der Publikation von Houliston et al. (2002) wurde die Wirkung von Thrombin auf die Expression von COX-1 und-2 beschrieben. Auch hier konnte eine gesteigerte COX-2-Expression, jedoch kein Einfluss auf die COX-1-Expression unter Thrombinbehandlung festgestellt werden. Eine frühere Publikation berichtet, dass die COX-1-Expression in der Aorta von Ratten und Leukozyten aus dem peripheren Blut durch eine Injektion mit LPS nicht gesteigert wird, dafür aber eine COX-2-Expression in erhöhtem Umfang stattfindet (Futaki N et al. 1997). Auch bei Untersuchungen an Mäusen mit Läsionen der Magenschleimhaut wurde eine Akkumulation von COX-2-, jedoch nicht von COX-1-mRNA unter inflammatorischen Bedingungen beobachtet (Mizuno H et al. 1997).

In eigenen Untersuchungen zeigte es sich, dass nicht nur Thrombin, sondern auch rhAPC eine gesteigerte COX-2-Expression bewirkt, wenngleich der beobachtete Effekt schwächer ausfiel als nach Behandlung mit Thrombin. Dieses ist wahrscheinlich wie schon in Abschnitt 4.3. beschrieben, auf die Möglichkeit des Thrombins zurückzuführen, sowohl über den PAR-1-Rezeptor als auch über andere Rezeptoren die Genexpression verschiedener Gene zu aktivieren. Die alleinige Wirkung von rhAPC über den EPCR-PAR-1-Komplex konnte in eigenen weiteren Untersuchungen unter Einsatz spezifischer Agonisten und Antagonisten gegen den EPCR und PAR-1 festgestellt werden. Untersuchungen zu einer möglichen Beteiligung des PAR-2 ergab, dass rhAPC keine COX-2-Expression über diesen Rezeptor aktiviert (Brueckmann et al. 2005).

Die Behandlung der Endothelzellen mit dem selektiven COX-2-Antagonisten, NS-398, bewirkt eine signifikante Hemmung der rhAPC-induzierten 6-keto-PGF_{1α}-Freisetzung. Diese Daten belegen, dass die gesteigerte PGF_{2α}-Freisetzung durch rhAPC über COX-2, nicht aber über COX-1, vermittelt ist.

Neben der Wirkung von rhAPC auf die COX-2 wurde eine eventuelle Beeinflussung der Prostaglandin-I₂-Synthase durch rhAPC-Behandlung untersucht. Die Behandlung mit PGH₂ führte zu einem signifikanten Anstieg der 6-keto-PGF_{1α}-Freisetzung aus HUVEC. Die PGI₂-Synthase hatte durch das exogen zugeführte PGH₂ mehr Ausgangsmaterial zur Umsetzung zu PGI₂. Die Behandlung der Endothelzellen mit PGH₂ und rhAPC konnte keinen steigernden Effekt gegenüber der alleinigen Behandlung mit PGH₂ zeigen, wodurch eine Beteiligung der PGIS am Zustandekommen der durch APC gesteigerten PGI₂-Synthese ausgeschlossen werden konnte.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Induktion der Cyclooxygenase-2 sehr wahrscheinlich eine pathophysiologisch wichtige Antwort von Endothelzellen auf die Behandlung mit rhAPC darstellt. Die hiermit verbundene gesteigerte Freisetzung von Prostacyclin repräsentiert möglicherweise einen wichtigen Mechanismus, über den die protektive Wirkung von APC in Bezug auf die Mikrozirkulation *in vivo*, also z.B. in der schweren Sepsis, zustande kommt

Kapitel 5: Zusammenfassung

Aktiviertes Protein C hat neben seinen antikoagulativen, profibrinolytischen, antiinflammatorischen und antiapoptotischen Eigenschaften noch zusätzlich Wirkungen, die insbesondere im Rahmen der Sepsistherapie von wichtiger Bedeutung sein können. APC nimmt damit einen wichtigen Platz im Wechselspiel zwischen Entzündung und Gerinnung ein. Studien an Patienten mit schwerer Sepsis haben gezeigt, dass die Behandlung mit rhAPC die Mortalität senkt. Diese günstige Wirkung von APC kommt unter anderem durch eine Modulation der Genexpression von verschiedenen Mediatoren in einer Vielzahl von Zellsystemen zustande. Die direkte antiinflammatorische Wirkung des APC wurde jedoch bisher nur *in vitro* gefunden. Eine eindeutige antiinflammatorische Wirkung des APC *in vivo* ist bis zu diesem Zeitpunkt nicht messbar gewesen. Umso mehr ist es von Interesse, die einzelnen Wirkmechanismen, über die APC seine protektive Wirkung in der Sepsis entfaltet, näher zu charakterisieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst mittels Affymetrix®-Genarray mögliche Angriffsorte von aktiviertem Protein C (APC) auf die endotheliale Genexpression aufgedeckt. Hierbei ergaben sich einige funktionell wichtige Zytokine, Chemokine und Mediatoren des Prostaglandinhaushalts die durch APC in ihrer Expressionsrate moduliert wurden. Hierzu gehörten das Chemokin Fractalkine, der Wachstumsfaktor und Immunmodulator Transforming Growth factor- β 2 und die im Prostanoidstoffwechsel bedeutsame Cyclooxygenase-2 (COX-2).

Nach ersten Screening-Experimenten wurden Bestätigungsexperimente auf messenger-RNA-Ebene und Proteinebene durchgeführt, beteiligte Rezeptoren und intrazelluläre Mechanismen näher untersucht, und es wurde in der Diskussion der Arbeit auf die mögliche funktionelle Relevanz der beobachteten Veränderungen eingegangen.

Für das Chemokin Fractalkine konnte in Übereinstimmung mit den Resultaten aus dem Affymetrix®-Genarray eine zeit- und konzentrationsabhängige Steigerung der endothelialen mRNA und des Proteins unter dem Einfluß von APC gezeigt werden. Es wurde festgestellt, dass nur das aktivierte Protein C eine Wirkung auf die Fractalkine-Synthese und -Freisetzung ausübt. Der Einsatz des Zymogens Protein C bewirkte keine Veränderungen auf die Fractalkine-Freisetzung. Es konnte ermittelt werden, dass APC seine Wirkung auf die

vermehrte Fractalkine-Expression ausübt, indem der Protease-aktivierbare Rezeptor-1 aktiviert wird. Eine Beteiligung des PAR-2 konnte ausgeschlossen werden.

Im Weiteren wurde die Wirkung von APC auf den Wachstumsfaktor und Immunmodulator TGF- β 2 mit Hilfe von rtPCR und Immunoassay genauer betrachtet. APC bewirkte eine Steigerung der mRNA und auch der Proteinfreisetzung von TGF- β 2 aus humanen Endothelzellen.

In folgenden *in vitro*-Versuchen an humanen Endothelzellen (HUVEC) wurden Mediatoren des Prostaglandinhaushalts untersucht: RhAPC bewirkte eine Steigerung der endothelialen Expression von COX-2-mRNA und COX-2-Protein. Der erhöhte endotheliale COX-2-Proteingehalt bedingte eine verstärkte Freisetzung des Syntheseprodukts Prostazyclin. Die Expression der konstitutiven COX-1 und der Prostaglandin-I₂-Synthase (PGIS) wurde durch APC nicht beeinflusst. Das nicht aktivierte Protein C hatte keinen Effekt auf die COX-2-Expression. Durch blockierende Antikörper gegen den PAR-1 (Protease-aktivierbarer Rezeptor-1) konnte ermittelt werden, dass APC sehr wahrscheinlich die COX-2-Expression in HUVEC durch Signaltransduktion über den PAR-1-Rezeptor moduliert. Wie bereits zuvor gezeigt, liegt die funktionelle Bedeutung einer gesteigerten COX-2-Expression und Prostazyclin-Synthese in der Verbesserung der Mikrozirkulation, der Reduktion der Kapillarpermeabilität, einer zytoprotektiven und plättchenaggregations-hemmenden Wirkung sowie der Reduktion der Zytokinfreisetzung aus aktivierten Monozyten.

Die klinische Bedeutung der hier beschriebenen und diskutierten Wirkmechanismen von APC sollte kritisch betrachtet werden, da meist suprathérapeutische Dosierungen von rhAPC eingesetzt wurden. Dennoch sind derartige Zellkulturuntersuchungen wichtig, um orientierende Hinweise auf die molekularen Wirkmechanismen einer pharmakologisch wirksamen Substanz zu bekommen. Weitere *in vivo* Untersuchungen müssen klären, ob die hier vorgeschlagenen Mechanismen auch *in vivo* von Bedeutung sind und für die günstigen Wirkungen von rhAPC auf das Überleben von Patienten mit schwerer Sepsis verantwortlich gemacht werden können.

Kapitel 6: Summary

In addition to its anticoagulant, profibrinolytic, anti-inflammatory and antiapoptotic properties activated protein C exerts activities, which can be of importance in the therapy of sepsis. Therefore APC has an important role in severe sepsis, which is characterized by an imbalance in hemostasis resulting in widespread coagulopathy and microvascular thrombosis. Treatment with rhAPC in patients with severe sepsis resulted in a reduction in mortality. This effect of APC is realized by a modulation of gene-expression of different mediators in a multitude of cells. From in vitro examinations it has been suggested that APC exhibits anti-inflammatory properties whereas in clinical trials systemic anti-inflammatory effects are still missing. Due to that there is an interest and need to define the properties of APC in detail, which contribute to its protective activity in sepsis.

Whithin this doctoral thesis the effects of APC were screened by using Affymetrix microarrays. By the use of these microarrays it was possible to demonstrate, that APC modulates the expression rate of some important functional cytokines, chemokines and mediators of prostaglandin-synthesis.

Important examples modulated by APC in their gene expression rate were the chemokine fractalkine, the growth factor and immune modulator transforming growth factor- β 2 and the cyclooxygenase-2 (COX-2), which is an important enzyme for prostaglandin-synthesis.

After screening-experiments with microarrays had been performed, positive results were verified on mRNA- and protein-levels. In addition to that receptors and intracellular mechanisms possibly involved were examined and their functional relevance was discussed whithin the discussion section of this doctoral thesis.

In accordance with gene-array results APC stimulated fractalkine-messenger RNA-gene transcription and release of fractalkine protein in a time- and dose-dependent manner. It was demonstrated that only activated protein C has an effect on the fractalkine synthesis. The zymogen Protein C had no influence on the release of fractalkine protein. In endothelial cells, most signalling responses of APC are mediated by the protease-activated receptor-1 (PAR-1). Here it was possible to prove an involvement of PAR-1 for APC-induced fractalkine release. A participation of a protease-activated receptor-2 (PAR-2) could be excluded.

Furthermore the effect of APC on the growth factor and immune modulator TGF- β 2 was detected by the methods of rtPCR and immunoassay. APC stimulated TGF- β 2-messenger RNA-gene transcription and release of TGF- β 2-protein from human endothelial cells.

In the following *in vitro* experiments performed with human endothelial cellc (HUVEC) several mediators of the prostaglandin-synthesis were examined: An upregulatory effect of rhAPC on mRNA-expression and on protein-synthesis of COX-2 was detectable. The increased endothelial COX-2-level was responsible for an increased release of prostacyclin. The expression of constitutive COX-1 as well as prostaglandin-I₂-synthase (PGIS) were not influenced by APC. Moreover protein C had no effect on COX-2-expression. It was demonstrated that the ability of rhAPC to induce an upregulation of COX-2-expression was mediated by PAR-1. This was shown by blocking PAR-1 with an anti-PAR-1-antibody. As published before an increased COX-2-expression and consecutively the upregulation of prostacyclin-synthesis improves the microcirculation, reduces capillar permeability, has a cytoprotective effect, inhibits platelet aggregation and results in a reduction of cytokine-release from monocytes.

The clinical relevance of the present results obtained at supra-therapeutic rhAPC concentrations must be judged cautiously. Nevertheless these *in vitro* data may lead to a better understanding of the multiple biological activities of rhAPC. Further *in vivo* examinations are needed to clarify, wether in *in vitro* observed effects are of importance under clinical conditions and how these beneficial effects of rhAPC contribute to the survival of patients with severe sepsis.

Kapitel 6: Literaturverzeichnis

- ACCM/SCCM Consensus Conference Committee (1992) Definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 20 (6): 864-874
- Alexander WR (2001) Cytokine receptor CX₃CR-1 and fractalkine: new factors in the atherosclerosis drama? *Circ Res* 89: 376-377
- Altrogge LM, Monard D (2000) An assay for high-sensitivity detection of thrombin activity and determination of proteases activating or inactivating protease-activated receptors. *Anal Biochem* 277: 33-45
- Annane D, Sebille V, Charpentier C, Bollaert PE, Francois B, Korach JM, Capellier G, Cohen Y, Azoulay E, Troche G, Chaumet-Riffaut P, Bellissant E (2002) Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA* 288: 886-887
- Arai I, Hamasaka Y, Futaki N, Takahashi S, Yoshikawa K, Higuchi S, Otoma S (1993) Effect of NS-398, a new nonsteroidal antiinflammatory agent, on gastric ulceration and acid secretion in rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 81: 259-270
- Bajzar L, Jain N, Wang P, Walker JB (2004) Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor: not just an inhibitor of fibrinolysis. *Crit Care Med* 32 (Suppl 5): 320-324
- Bajzar L, Nesheim M, Tracy PB (1996) The profibrinolytic effect of activated protein C in clots formed from plasma is TAFI-dependent. *Blood* 88: 2093-2100
- Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ (1997) A new class of membrane-bound chemokine with a CX₃C motif. *Nature* 385: 640-644
- Bajzar L, Manuel R, Nesheim M (1995) Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* 270: 14477-14484
- Beck GC, Ludwig F, Schulte J, van Ackern K, van der Woude FJ, Yard BA (2003) Fractalkine is Not a Major Chemoattractant for the Migration of Neutrophils Across Microvascular Endothelium. *Scan J Immunol* 58: 180-187

- Beckmann RJ, Schmidt RJ, Santerre RF, Plutzky J, Crabtree GR, Long GL (1985) The structure and evolution of a 461 amino acid human protein C precursor and its messenger RNA, based upon the DNA sequence of cloned human liver cDNAs. *Nucleic Acids Res* 13: 5233-5247
- Bernard GR, Vincent J-L, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ, for the Recombinant Human Activated Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) Study Group (2001) Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *New Engl J Med* 344: 699-709
- Bizios R, Lai L, Fenton JW 2nd, Malik AB (1986) Thrombin-induced chemotaxis and aggregation of neutrophils. *J Cell Physiol.* 128: 485-490
- Boehme MW, Deng Y, Raeth U, Bierhaus A, Ziegler R, Stremmel W, Nawroth PP (1996) Release of thrombomodulin from endothelial cells by concerted action of TNF-alpha and neutrophils: in vivo and in vitro studies. *Immunology* 87: 134-140
- Boldt J, Papsdorf M, Rothe A, Kumle B, Piper S (2000) Changes of the hemostatic network in critically ill patients – is there a difference between sepsis, trauma and neurosurgery patients? *Crit Care Med* 28: 445-450
- Bovill EG, Bauer KA, Dickerman JD, Callas P, West B (1989) The clinical spectrum of heterozygous protein C deficiency in a large New England kindred. *Blood* 73: 712-717
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Brater DC, Harris C, Redfern JS, Gertz BJ (2001) Renal effects of COX-2-selective inhibitors. *Am J Nephrol* 21: 1-15
- Brueckmann M, Marx A, Weiler HM, Liebe V, Lang S, Kaden JJ, Zieger W, Borggreffe M, Huhle G, Haase KK (2003) Stabilization of monocyte chemoattractant protein-1-mRNA by activated protein C. *Thromb Haemost* 89: 149-160

- Brueckmann M, Hoffmann U, De Rossi L, Weiler HM, Liebe V, Lang S, Kaden JJ, Borggreffe M, Haase KK, Huhle G (2004a) Activated protein C inhibits the release of macrophage inflammatory protein-1-alpha from THP-1 cells and from human monocytes. *Cytokine* 26: 106-113
- Brueckmann M, Hoffmann U, Dvortsak E, Lang S, Kaden JJ, Borggreffe M, Haase KK (2004b) Drotrecogin alfa (activated) inhibits NF-kappa B activation and MIP-1-alpha release from isolated mononuclear cells of patients with severe sepsis. *Inflammation Research* 53: 528-533
- Brueckmann M, Engelhardt C, Fukudome K, Lang S, Hoffmann U, Kaden JJ, Haase KK, Borggreffe M, Huhle G (2004c) Recombinant human activated protein C upregulates production of PDGF-BB in human endothelial cells via activation of protease-activated receptor-1. *Intensive Care Medicine* 30 (Suppl. 1): S211
- Brueckmann M, Horn S, Lang S, Fukudome K, Schulze Nahrup A, Hoffmann U, Kaden JJ, Borggreffe M, Haase KK, Huhle G (2005) Recombinant human activated protein C upregulates cyclooxygenase-2 expression in endothelial cells via binding to endothelial cell protein C receptor and activation of protease-activated receptor-1. *Thrombosis and Haemostasis* 93: 743-750
- Brueckmann M, Schulze Nahrup A, Lang S, Bertsch T, Fukudome K, Liebe V, Kaden JJ, Hoffmann U, Borggreffe M, Haase KK, Huhle G (2006) Recombinant human activated protein C upregulates the release of soluble fractalkine from human endothelial cells. *British Journal of Haematology* 133: 550-557
- Camerer E, Kolsto A-B, Prydz H (1996) Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res* 81: 1-41
- Camitta MGW, Gabel SA, Chulada P, Bradbury JA, Langenbach R, Zeldin DC, Murphy E (2001) Cyclooxygenase-1 and -2 knockout mice demonstrate increased cardiac ischemia/reperfusion injury but are protected by acute preconditioning. *Circulation* 104: 2453-2458

- Catella-Lawson F, McAdam B, Morrison BW, Kapoor S, Kujubu D, Antes L, Lasseter KC, Quan H, Gertz BJ, FitzGerald GA (1999) Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids. *J Pharmacol Exp Ther* 289: 735-741
- Cheng T, Liu D, Griffin JH, Fernandez JA, Castellino F, Rosen ED, Fukudome K, Zlokovic BV (2003) Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med* 9: 338-342
- Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, Lawson JA, FitzGerald GA (2002) Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A₂. *Science* 296: 539-541
- Cockwell P, Chakravorty SJ, Girdlestone J, Savage Co (2002) Fractalkine expression in human renal inflammation. *J Pathol* 196: 85-90
- Cohen J (2002) The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420: 885-891
- Combadiere C, Potteaux S, Gao J, Esposito B, Casanova S, Lee EJ, Debre P, Tedgui A, Murphy PM, Mallat Z (2003) Decreased atherosclerotic lesion formation in CX₃CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation* 107: r27-r34
- Conrad J, Bauer KA, Gruber A, Griffin JH, Schwarz HP, Horellou MH, Samama MM, Rosenberg RD (1993) Normalization of markers of coagulation activation with a purified protein C concentrate in adults with homozygous protein C deficiency. *Blood* 82: 1159-1164
- Conway EM, Rosenberg RD (1988) Tumor necrosis factor suppresses transcription of the thrombomodulin gene in endothelial cells. *Mol Cell Biol* 8: 5588-5592
- Cybulsky MI, Hegele RA (2003) The fractalkine receptor CX₃CR1 is a key mediator of atherogenesis. *J Clin Invest* 111: 1118-1120
- Dahlbäck B, Hillarp A, Rosen S, Zoeller B (1996) Resistance to activated protein C, the FV:Q506 allele, and venous thrombosis. *Ann Hematol* 72: 166-176
- Dhainaut JF, Marin N, Mignon A, Vinsonneau C (2001) Hepatic response to sepsis: Interaction between coagulation and inflammatory processes. *Crit Care Med* 29 (Suppl. 1): 42-47

- Dignass AU, Podolsky DK (1993) Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of Transforming Growth Factor β . *Gastroenterology* 105: 1323-1332
- Drake WT, Lopes NN, Fenton JW 2nd, Issekutz AC (1992) Thrombin enhancement of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α induced polymorphonuclear leukocyte migration. *Lab Invest* 67: 617-627
- Dreyfus M, Magny JF, Bridey F, Schwarz HP, Planche C, Dehan M, Tchernia G (1991) Treatment of homozygous protein C deficiency and neonatal purpura fulminans with purified protein C concentrate. *N Engl J Med* 325: 1565-1568
- Ejima K, Layne MD, Carvajal IM, Kritek PA, Baron RM, Chen YH, vom Saal J, Levy BD, Yet SF, Perrella MA (2003) Cyclooxygenase-2 deficient mice are resistant to endotoxin-induced inflammation and death. *FASEB J* 17: 1325-1327
- Esmon CT (1989) The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem* 264: 4743-4746
- Esmon CT (2000a) The anticoagulant and antiinflammatory roles of the protein C anticoagulant pathway. *J Autoimmun* 15: 113-116
- Esmon CT (2000b) The protein C pathway. *Crit Care Med* 28 (Suppl.): S44-S48
- Esmon CT (2000c) The endothelial cell protein C receptor. *Thromb Haemost* 83: 639-643
- Esmon CT (2001) Protein C anticoagulant pathway and its role in controlling microvascular thrombosis and inflammation. *Crit Care Med* 29 (Suppl.): S48-S52
- Faure S, Meyer L, Costagliola D, Vaneensberghe C, Genin E, Autran B, Delfraissy JF, McDermott DH, Murphy PM, Debre P, Theodorou I, Combadiere C (2000) Rapid progression to AIDS in HIV⁺ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX₃CR1. *Science* 287: 2274-2277
- Faust SN, Levin M, Harrison OB, Goldin RD, Lockhart MS, Kondaveeti S, Laszik Z, Esmon CT, Heydermann RS (2001) Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis. *N Engl J Med* 345: 408-416
- Feistritzer C, Riewald M (2005) Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation. *Blood* 105: 3178-3184

- Feng L, Chen S, Garcia GE, Xia Y, Siani MA, Botti P, Wilson CB, Harrison JK, Bacon KB (1999) Prevention of crescentic glomerulonephritis by immunoneutralization of the fractalkine receptor CX₃CR1. *Kindney Int* 56: 612-620
- Finigan JH, Dudek SM, Singleton PA, Chiang ET, Jacobson JR, Camp SM, Ye SQ, Garcia JGN (2005) Activated protein C mediates novel lung endothelial barrier enhancement: role of sphingosine 1-phosphate receptor transactivation. *J Biol Chem* 280: 17286-17293
- Fink MP, Rothschild HR, Deniz YF, Wang H, Lee PC (1989) Systemic and mesenteric O₂ metabolism in endotoxic pigs: Effect of ibuprofen and meclofenamate. *J Appl Physiol* 67: 1950-1957
- Fletcher JR, Collins JN, Graves EDI, Luterman A, Williams MD, Izenberg SD, Rodning CB (1993) Tumor necrosis factor-induced mortality is reversed with cyclooxygenase inhibition. *Ann Surg* 217: 668-674
- Fletcher JR, Ramwell PW (1978) E. coli endotoxin shock in the dog; treatment with lidocaine or indomethacin. *Br J Pharmacol* 64: 185-191
- Flisiak R, Prokopowicz D (2000) Transforming Growth Factor-β1 as a surrogate marker of hepatic dysfunction in chronic liver disease. *Clin Chem Lab Med* 38: 1129-1131
- Fourrier F, Chopin C, Goudemand J, Hendrycx S, Caron C, Rime A, Marey A, Lestavel P (1992) Septic shock, multiple organ failure, and disseminated intravascular coagulation: compared patterns of antithrombin III, protein C, and protein S deficiencies. *Chest* 101: 816-823
- Fourrier F, Jourdain M, Tournoy A, Gosset P, Mangalaboyi J, Chopin C (1998) Effects of a combined antithrombin III and protein C supplementation in porcine acute endotoxic shock. *Shock* 10: 364-370
- Foussat A, Bouchet-Delbos L, Berrebi D, Durand-Gasselin I, Coulomb-L'Hermine A, Krzysiek R, Glanaud P, Levy Y, Emilie D (2001) Deregulation of the expression of the fractalkine/fractalkine receptor complex in HIV-infected patients. *Blood* 98: 1678-1686

- Fraticegli P, Sironi M, Bianchi G, D`Ambrosio D, Albanesi C, Stoppacciaro A, Chieppa M, Allavena P, Ruco L, Girolomoni G, Sinigaglia F, Vecchi A, Mantovani A (2001) Fractalkine (CX3CL1) as an amplification circuit of polarized Th1 responses. *J Clin Invest* 107: 1173-1181
- Fujimoto K, Imaizumi T, Yoshida H, Takanashi S, Okumura K, Satoh K (2001) Interferon- γ stimulates fractalkine expression in human bronchial epithelial cells and regulates mononuclear cell adherence. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25: 233-238
- Fukudome K, Kursawa S, Stearns-Kurosawa DJ, He X, Rezaie AR, Esmon CT (1996) The endothelial cell protein C receptor: cell surface expression and direct ligand binding by the soluble receptor. *J Biol Chem* 271: 17491-17498
- Fukukome K, Esmon CT (1994) Identification, cloning and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem* 269: 26486-26491
- Furuichi K, Wada T, Iwata Y, Sakai N, Yoshimoto K, Shimizu M, Kobayashi K, Takasawa K, Kida H, Takeda S, Matsushima K, Yokoyama H (2001) Upregulation of fractalkine in human crescentic glomerulonephritis. *Nephron* 87: 314-320
- Futaki N, Takahashi S, Kitagawa T, Yamakawa Y, Tanaka M, Higuchi S (1997) Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by NS-398 in endotoxin shock rats in vivo. *Inflamm Res* 46: 496-502
- Garcia GE, Xia Y, Chen S, Wang Y, Ye RD, Harrison JK, Bacon KKB, Zerwes H-G, Feng L (2000) NF- κ B-dependent fractalkine induction in rat aortic endothelial cells stimulated by IL-1 β , TNF- α , and LPS. *J Leukoc Biol* 67: 577-584
- Garton KJ, Gough PJ, Blobel CP, Murphy G, Greaves DR, Dempsey PJ, Raines EW (2001) Tumor necroses factor- α -converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem* 276: 37993-38001
- Graham MF, Bryson GR, Diegelmann RF (1990) Transforming Growth Factor β 1 selectively augments collagen synthesis by human intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology* 99: 447-453

- Greaves DR, Hakkinen T, Lucas AD, Liddiard K, Jones E, Quinn CM, Senaratne J, Grenn FR, Tyson K, Boyle J, Shanahan C, Weissberg PL, Gordon S, Yla-Hertuala S (2001) Linked chromosome 16q13 chemokines, macrophage-derived chemokine, fractalkine, and thymus- and activation-regulated chemokine, are expressed in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 923-929
- Grey ST, Tsuchida A, Hau H, Orthner CL, Salem HH, Hancock WW (1994) Selective inhibitory effects of the anticoagulant activated protein C on the responses of human mononuclear phagocytes to LPS, IFN- γ , or phorbol ester. *J Immunol* 153: 3664-4672
- Grinnel BW, Joyce D (2001) Recombinant human activated protein C: A system modulator of vascular function for treatment of severe sepsis. *Crit Care Med* 29 (Suppl.): S53-S61
- Grinnell BW, Hermann RB, Yan SB (1994) Human protein C inhibits selectin-mediated cell adhesion: role of unique fucosylated oligosaccharide. *Glycobiology* 4: 221-225
- Gruber A, Griffin JH (1992) Direct detection of activated protein C in blood from human subjects. *Blood* 79: 2340-2348
- Guo H, Liu D, Gelbard H, Cheng T, Insalaco R, Fernandez JA, Griffin JH, Zlokovic BV (2004) Activated protein C prevents neuronal apoptosis via protease activated receptors 1 and 3. *Neuron* 41: 563-572
- Harbrecht BG, Stadler J, Demetris AJ, Simmons RL, Billiar TR (1994) Nitric oxide and prostaglandins interact to prevent hepatic damage during murine endotoxemia. *Am J Physiol* 266: G1004-G1010
- Harlan JM, Winn RK (2002) Leukocyte-endothelial interactions: Clinical trials of anti-adhesion therapy. *Crit Care Med* 30 (5 Suppl.): S214-S219
- Hartman DL, Bernard GR, Helterbrand JD, Yan SB, Fisher CJ (1998) Recombinant human activated protein C (rhAPC) improves coagulation abnormalities associated with severe sepsis. *Intensive Care Med* 24: (Suppl. 1): S77
- He XF, Wen ZB, Liu MJ, Zhang H, Li Q, He SL (2004) Levels of plasma des-gamma-carboxy-protein C and prothrombin in patients with liver diseases. *World J Gastroenterol* 10: 3073-3075

- Heeb MJ, Espana F, Griffin JH (1989) Inhibition and complexation of activated protein C by two major inhibitors in plasma. *Blood* 73: 446-454
- Heldin CH, Miyazono K, Dijke P (1997) TGF- β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390: 465-471
- Hesselvik F, Malm J, Dählback B, Blomback M (1991) Protein C, Protein S and C4b-binding protein in severe infection and septic shock. *Thromb Haemost* 65: 126-129
- Hicok CK, Thomas T, Gori F, Rickard DJ, Spelsberg TC, Lawrence Riggs B (1998) Development and characterization of conditionally immortalized osteoblast precursor cell lines from human bone marrow stroma. *J Bone and Miner Res* 13(2): 205-217
- Hinz B, Brune K (2002) Cyclooxygenase-2 – 10years later. *J Pharmacol* 300: 367-375
- Hosokawa Y, Nakanishi T, Yamaguchi D, Nakae H, Matsuo T (2005) Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, in periodontal diseased tissue. *Clin Exp Immunol* 139: 506-512
- Houliston RA, Keogh RJ, Sugden D, Dudhia J, Carter TD, Wheller Jones C (2002) Protease-activated receptors upregulate Cyclooxygenase-2 expression in human endothelial cells. *Thromb Haemost* 88: 321-328
- Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiyama H, Schall TJ, Yoshie O (1997) Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 91: 521-530
- Imaizumi T, Matsumiya T, Fujimoto K, Okamoto K, Cui X, Ohtaki U, Yoshida H, Satoh K (2000) Interferon- γ stimulates the expression of CX3CL1/fractalkine in cultured human endothelial cells. *Tohoku J Exp Med* 192: 127-139
- Isobe H, Okajuma K, Harada N, Liu W, Okabe H (2004) Activated protein C reduces stress-induced gastric mucosal injury in rats by inhibiting the endothelial cell injury. *J Thromb Haemost* 2: 313-320
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins; identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52: 2745-2756

- Jones G, Hurley JV (1984) The effect of prostacyclin on the adhesion of leucocytes to injured vascular endothelium. *J Pathol* 142: 51-59
- Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW (2001) Gene expression profile of antithrombotic protein C defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* 276: 11199-11203
- Kehrl JH, Roberts AB, Wakerfield LM, Jakowlew S, Sporn MB, Fauci AS (1986) Transforming Growth Factor β is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J Immunol* 137: 3855-3860
- Ketteler M, Noble NA, Border WA (1994) Increased expression of transforming growth factor-beta in renal disease. *Curr Opin Nephrol Hyertens* 3: 446-452
- Kisiel W (1979) Human plasma protein C. Isolation, characterization and mechanism of activation by α -thrombin. *J Clin Invest* 64: 761-769
- Kojima S, Nara K, Rifkin DB (1993) Requirement for transglutaminase in the activation of latent transforming growth factor- β in bovine endothelial cells: *J Cell Biology* 121: 439-448
- Kuliopulos A, Covic L, Seeley SK, Sheridan PJ, Helin J, Costello CE (1999) Plasmin desensitization of the PAR1 thrombin receptor: kinetics, sites of truncation, and implications for thrombolytic therapy. *Biochemistry* 38: 4572-4585
- Lammarre J, Hayes MA, Wollenberg GK, Hussaini I, Hall SW, Gonias SL (1991) An alpha 2-macroglobulin receptor-dependent mechanism for the plasma clearance of transforming growth factor-beta 1 in mice. *J Clin Invest* 87: 39-44
- Langenbach R, Morham SG, Tian HF, Loftin CD, Ghanayem BJ, Chulada PC, Mahler JF, Lee CA, Goulding EH, Kluckmann KD et al. (1995) Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell* 83: 483-492
- Laszik Z, Mitro A, Taylor FB Jr, Ferrell G, Esmon CT (1997) Human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels: implications for the control of the protein C pathway. *Circulation* 96: 3633-3640

- Lee SH, Soyoola E, Chanmugam P, Hart S, Sun W, Zhong H, Liou S, Simmons D, Hwang D (1992) Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 267: 25934-15938
- Lentz SR, Tsiang M, Sadler JE (1991) Regulation of thrombomodulin by tumor necrosis factor-alpha: Comparison of transcriptional and posttranslational mechanisms. *Blood* 77: 542-550
- Levi M, ten Cate H, van der Poll T (2002) Endothelium: Interface between coagulation and inflammation. *Crit Care Med* 30 (Suppl.): S220-S224
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G (2003) 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 31: 1250-1256
- Lorente JA, Garcia-Frade LK, Landin L, Pablo RD, Torrado C, Renes E, Garcia-Avello A (1993) Time course of hemostatic abnormalities in sepsis and its relation to outcome. *Chest* 103: 1536-1542
- Lu T, Burdelya LG, Swiatkowski SM, Boiko AD, Howe PH, Stark GR, Gudkov AV (2004) Secreted transforming growth factor β 2 activates NF- κ B, blocks apoptosis, and is essential for the survival of some tumor cells. *PNAS* 101: 7112-7117
- Ludemann MJ, Kataoka H, Srinivasan Y, Esmon NL, Esmon CT, Coughlin SR (2005) PAR1 cleavage and signaling in response to activated protein C and thrombin. *J Biol Chem* 280: 13122-13128
- Manasia A, Kang H, Hannon E, Lu Y, Oropello J, Leibowitz A, Stein J, Benjamin E (1997) Effects of the stable prostacyclin analogue iloprost on mesenteric blood flow in porcine endotoxic shock. *Crit Care Med* 25:1222-1227
- Marek A, Brodzicki J, Liberek A, Korzon M (2002) TGF- β (transforming growth factor- β) in chronic inflammatory conditions – a new diagnostic and prognostic marker? *Med Sci Monit* 8(7): RA145-151
- Marlar RA, Krssin DC, Madden RM (1993) Contribution of plasma proteinase inhibitors to the regulation of activated protein C in plasma. *Thromb Haemost* 69: 16-20

- McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA (1999) Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: The human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 272-277
- Miletich J, Sherman L, Broze G Jr (1987) Absence of thrombosis in subjects with heterozygous protein C deficiency. *N Engl J Med* 317: 991-996
- Mizuno H, Sakamoto C, Matsuda K, Wada K, Uchida T, Noguchi H, Akamatsu T, Kasuga M (1997) Induction of cyclooxygenase 2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice. *Gastroenterology* 112: 387-397
- Mizutani A, Okajima K, Uchiba M, Noguchi T (2000) Activated protein C reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation. *Blood* 95:3781-3787
- Möller AD, Grände PO (1997) Low dose prostacyclin has potent capillary permeability-reducing effect in cat skeletal muscle in vivo. *Am J Physiol* 273: H200-H207
- Möller AD, Grände PO (2001) Beneficial effects of low-dose prostacyclin on cat intestinal perfusion during endotoxemia as evaluated with microdialysis and oxygen transport variables. *Crit Care Med* 29: 351-358
- Moore KL, Andreoli SP, Esmon NL, Esmon CT, Bang NU (1987) Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium *in vitro*. *J Clin Invest* 79: 124-130
- Moore KL, Esmon CT, Esmon NL (1989) Tumor necrosis factor leads to the internalization and degradation of thrombomodulin from the surface of bovine aortic endothelial cells in culture. *Blood* 73: 159-165
- Morham SG, Langenbach R, Loftin CD, Tiano HF, Vouloumanos N, Jennette JC, Mahler JF, Kluckmann KD, Ledford A, Lee CA, Smithies O (1995) Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* 83: 473-482
- Mosnier LO, Gale AJ, Yegneswaran S, Griffin JH (2004) Activated protein C variants with normal cytoprotective but reduced anticoagulant activity. *Blood* 104: 1740-1744

- Mosnier LO, Griffin JH (2003) Inhibition of staurosporine-induced apoptosis of endothelial cells by activated protein C requires protease-activated receptor-1 and endothelial cell protein C receptor. *Biochem J* 272: 65-70
- Murakami K, Okajima K, Uchiba M, Johno M, Nakagaki T, Okabe H, Takatsuki K (1996) Activated protein C attenuates endotoxin-induced pulmonary vascular injury by inhibiting activated leukocytes in rats. *Blood* 87: 642-647
- Murakami K, Okajima K, Uchiba M, Johno M, Nakagaki T, Okabe H, Takatsuki K (1997) Activated protein C prevents LPS-induced pulmonary vascular injury by inhibiting cytokine production. *Am J Physiol* 272: L197-202
- Murin S, Marelich GP, Arroliga AC, Matthay RA (1998) Hereditary thrombophilia and venous thromboembolism. *Am J Resp Crit Care Med* 158: 1369-1373
- Nanki T, Imai T, Nagasaka K, Urasaki Y, Nonomura Y, Taniguchi K, Hayashida K, Hasegawa J, Yoshie O, Miyasaka N (2002) Migration of CX3CR1-positive T cells producing type 1 cytokines and cytotoxic molecules into the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 46: 2878-2883
- Nawroth PP, Stern DM (1986) Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 163: 740-745
- Nunes I, Gleizes PE, Mezt CN, Rifkin DB (1997) Latent transforming growth factor- β binding protein domains involved in activation and transglutaminase-dependent cross-linking of latent transforming growth factor- β . *J Cell Biology* 136: 1151-1163
- O`Sullivan MG, Huggins EMJ, Meade EA, DeWitt DL, McCall CE (1992) Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 in alveolar macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 187: 1123-1127
- Okajima K, Koga S, Kaji M, Inoue M, Nakagaki T, Funatsu A, Okabe H, Takatsuki K, Aoki N (1990) Effect of protein C and activated protein C on coagulation and fibrinolysis in normal human subjects. *Thromb Haemost* 63: 48-53
- Pan Y, Lloyd C, Zhou H, Dolich S, Deeds J, Gonzalo JA, Vath J, Gosselin M, Ma J, Dussault B, Woolf E, Alperin G, Culpepper J, Gutierrez-Ramos JC, Gearing D (1997) Neurotactin, a membrane anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature* 387: 611-617

- Parry MA, Myles T, Tschopp J, Stone SR (1996) Cleavage of the thrombin receptor: identification of potential activators and inactivators. *Biochem J* 320: 335-341
- Pepper MS, Belin C, Montesano R, Orci L, Vassalli JD (1990) Transforming growth factor-beta-1 modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells in vitro. *J Cell Biol* 111: 743-755
- Phan SH, Gharaee-Kermani M, McGarry B, Kunkel SL, Wolber FW (1992) Regulation of rat pulmonary artery endothelial cell transforming growth factor- β production by IL-1 β and tumor necrosis factor- α . *J Immunol* 149: 103-106
- Philip A, O'Connor-Mccourt MD (1991) Interaction of transforming growth factor-beta 1 with alpha 2-macroglobulin. Role in transforming growth factor-beta 1 clearance. *J Biol Chem* 266: 22290-22296
- Pintavorn P, Ballermann BJ (1997) TGF- β and the endothelium during immune injury. *Kidney International* 51: 1401-1412
- Powars D, Larsen R, Johnson J, Hulbert T, Sun T, Patch MJ, Francis R, Chan L (1993) Epidemic meningococemia and purpura fulminans with induced protein C deficiency. *Clin Infect Dis* 17: 254-261
- Rasmussen I, Arvidsson D, Zak A, Haglund UH (1992) Splanchnic and total body oxygen consumption in experimental fecal peritonitis in pigs: effects of dextran and iloprost. *Circ Shock* 36: 299-306
- Raychaudhuri SP, Jiang WY, Farber EM (2001) Cellular localization of fractalkine at sites of inflammation: antigen-presenting cells in psoriasis express high levels of fractalkine. *Br J Dermatol* 144: 1105-1113
- Raychaudhury A, D'Amore PA (1991) Endothelial cell regulation by transforming growth factor-beta. *J Cell Biochem* 47: 224-229
- Reddy RC, Chen GH, Tateda K, Tsai WC, Phare SM, Mancuso P, Peters-Golden M, Standiford TJ (2001) Selective inhibition of COX-2 improves early survival in murine endotoxemia but not in bacterial peritonitis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L537-L543

- Reddy ST, Herschman HR (1994) Ligand-induced prostaglandin synthesis requires expression of the TIS10/PGS-2 prostaglandin synthase gene in murine fibroblasts and macrophages. *J Biol Chem* 269: 15473-15480
- Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W (2002) Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science* 296: 1880-1882
- Riewald M, Ruf W (2005) Protease-Activated Receptor-1 signalling by activated protein C in cytokine pertubated endothelial cells is distinct from thrombin signalling. *J Biol Chem* 280: 19808-19814
- Rigby AC, Grant MA (2004) Protein S: a conduit between anticoagulation and inflammation. *Crit Care Med* 32 (Suppl. 3): 336-341
- Rimaniol A, Till SJ, Garcia GE, Capel F, Godot V, Balabanian K, Durand-Gasselien I, Varga EV, Simonneau G, Emilie D, Durham SR, Humbert M (2003) The CX₃C chemokine fractalkine in allergic asthma and rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 112: 1139-1146
- Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson B, Tomlanovich M for the Early Goal-Directed Therapy Collaborative Group (2001) Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 345: 1368-1377
- Roback MG, Stack AM, Thompson C, Brugnara C, Schwarz HP, Saladino RA (1987) Activated protein C concentrate for the treatment of meningococcal endotoxin shock in rabbits. *Shock* 9: 138-142
- Robak T (1995) Other cytokines. In: *Robak T Biology and characteristics of cytokines*: 270-286
- Roberts AB, Sporn MB (1993) Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor- β (TGF- β). *Growth Factors* 8: 1-9
- Robetorye RS, Rodgers GM (2001) Update on selected inherited venous thrombotic disorders. *Am J Hematol* 68: 256-268
- Robinson LA, Nataraj C, Thomas DW, Howell DN, Griffiths R, Bautch V, Patel DD, Feng L, Coffman TM (2000) A role for fractalkine and its receptor (CX₃CR1) in cardiac allograft rejection. *J Immunol* 165: 6067-6072

- Saksela O, Moscatelli D, Rifkin DB (1987) The opposing effects of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta on the regulation of plasminogen activator activity in capillary endothelial cells. *J Cell Biol* 105: 957-963
- Santambrogio L, Hochwald GM, Saxena B, Leu CH, Martz JE, Carlino JA, Ruddle NH, Palladino MA, Gold LI, Thorbecke GJ (1993) Studies on the mechanisms by which transforming growth-beta (TGF- β) protects against allergic encephalomyelitis. Antagonism between TGF- β and tumor necrosis factor. *J Immunol* 151: 1116-1127
- Scheeren T, Radermacher P (1997) Prostacyclin: New aspects of an old substance in the treatment of critically ill patients. *Intensive Care Med* 23: 146-158
- Schmassmann A, Peskar BM, Stettler C, Netzer P, Stroff T, Flogerzi B, Halter F (1998) Effects of inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in chronic gastrointestinal ulcer models in rats. *Br J Pharmacol* 123: 795-804
- Schmidt-Supprian M, Murphy C, While B, Lawler M, Kapurniotu A, Voelter W, Smith O, Bernhagen J (2000) Activated protein C inhibits tumor necrosis factor and macrophage migration inhibitory factor production in monocytes. *Eur Cytokine Netw* 11: 407-413
- Scully MF, Toh CH, Hoogendoorn H, Manuel RP, Nesheim ME, Solymoss S, Giles AR (1993) Activation of protein C and its distribution between its inhibitors, protein C inhibitor, α_1 -antitrypsin and α_2 -macroglobulin, in patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 69: 448-453
- Seligsohn U, Berger A, Abend M, Rubin L, Attias D, Zivelin A, Rapaport SI (1984) Homozygous protein C deficiency manifested by massive venous thrombosis in the newborn. *N Engl J Med* 310: 559-562
- Shoup M, He LK, Liu H, Shankar R, Gamelli R (1998) Cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 improves survival and restores leukocyte counts in burn infection. *J Trauma* 45: 215-221
- Strong VE, Mackrell PJ, Concannon EM, Naama HA, Schaefer PA, Shaftan GW, Stapleton PP, Daly JM (2000) Blocking prostaglandin E2 after trauma attenuates pro-inflammatory cytokines and improves survival. *Shock* 14: 374-379

- Sukkar MB, Issa R, Xie S, Oltmanns U, Newton R, Chung KF (2004) Fractalkine/CX₃CL1 production by human airway smooth muscle cells: induction by IFN- γ and TNF- α and regulation by TGF- β and corticosteroids. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L1230-L1240
- Takeuchi M, Alard P, Streilein JW (1998) TGF- β promotes immune deviation by altering accessory signals of antigen-presenting cells. *J Immunol* 160: 1589-1597
- Taylor FB Jr, Chang A, Esmon CT, D'Angelo A, Vigano-D'Angelo S, Blick KE (1987) Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of Escherichia coli infusion in the baboon. *J Clin Invest* 79: 918-925
- Taylor FB Jr, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Ferrell G, Chang ACK, Laszik Z, Kosanke S, Peer G, Esmon CT (2000) The endothelial cell protein C receptor aids in host defense against Escherichia coli sepsis. *Blood* 95: 1680-1686
- ten Cate H, Bauer KA, Levi M, Edgington TS, Sublett RD, Barzegar S, Kass BL, Rosenberg RD (1993) The activation of factor X and prothrombin by recombinant factor VIIa in vivo is mediated by tissue factor. *J Clin Invest* 92:1207-1212
- Tong N, Perry SW, Zhang Q, James HJ, Guo H, Brooks A, Bal H, Kinnear SA, Fine S, Epstein LG, Dairaghi D, Schall TJ, Gendelman HE, Dewhurst S, Scharer LR, Gelbard HA (2000) Neuronal fractalkine expression in HIV-1 encephalitis: roles for macrophage recruitment and neuroprotection in the central nervous system. *J Immunol*. 164: 1333-1339
- Träger K, Matejovic M, Zülke C, Vlatten A, Vogt J, Wachter U, Altherr J, Brinkmann A, Jauch K, Georgieff M, Radermacher P (2000) Hepatic O₂ exchange and liver energy metabolism in hyperdynamic porcine endotoxemia: effects of iloprost. *Intensive Care Med* 26(10): 1531-1539
- Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, Domae N, Imai T (2001) Fractalkine and vascular injury. *Trends Immunology* 22: 602-607
- Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, Nagano Y, Yoshie O, Imai T (2003) Fractalkine in vascular biology; from basic research to clinical disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 34-40

- Van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, Vlasselaerts D, Ferdinande P, Lauwerts P, Bouillon R (2001) Intensive insulin therapy in critically ill patients. *N Engl J Med* 345: 1359-1367
- Vervloet MG, Thijs LG, Hack CE (1998) Derangements of coagulation and fibrinolysis in critically ill patients with sepsis and septic shock. *Semin Thromb Hemost* 24: 33-44
- Volin MV, Woods JM, Amin MA, Connors MA, Harlow LA, Koch AE (2001) Fractalkine: a novel angiogenic chemokine in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 159: 1521-1530
- Whelton A, Maurath CJ, Verburg KM, Geis GS (2000) Renal safety and tolerability of celecoxib, a novel cyclooxygenase-2 inhibitor. *Am J Ther* 7: 159-175
- White B, Schmidt M, Murphy C, Linvingstone W, O'Toole D, Lawler M, O'Neill L, Kelleher D, Schwarz HP, Smith OP (2000) Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced nuclear factor kappaB (NF-kappaB) and tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) production in the THP-1 monocytic cell line. *Br J Haematol* 110: 130-134
- Xu J, Esmon CT (1999) Endothelial cell protein C receptor (EPCR) constitutively translocates into the nucleus and also mediates activated protein C, but not protein C, nuclear translocation. *Thromb Haemost* 82 (Suppl.): 206
- Yamagiva S, Gray JD, Hashimoto S, Horwitz DA (2001) A role for TGF- β in the generation and expansion of CD4 + CD25 + regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol* 166: 7282-7289
- Yan SB, Grinnel BW (1994) Antithrombotic and anti-inflammatory agents for the protein C coagulant pathway. *Ann Rep Med Chem* 11: 103-112
- Yuksel M, Okajima K, Uchiba M, Horiuchi S, Okabe H (2002) Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production by inhibiting activation of both nuclear factor-kappa B and activator protein-1 in human monocytes. *Thromb Haemost* 88: 267-273
- Zlontnik A, Yoshie O (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12: 121-127

Kapitel 8: Anhang

8.1. Eigene Veröffentlichungen

Publikationen

Brueckmann M, Horn S, Lang S, Fukudome K, **Schulze Nahrup A**, Hoffmann U, Kaden JJ, Borggrefe M, Haase KK, Huhle G (2005) Recombinant human activated protein C upregulates cyclooxygenase-2 expression in endothelial cells via binding to endothelial cell protein C receptor and activation of protease-activated receptor-1. *Thrombosis and Haemostasis* 93: 743-750

Brueckmann M, **Schulze Nahrup A**, Lang S, Bertsch T, Fukudome K, Liebe V, Kaden JJ, Hoffmann U, Borggrefe M, Haase KK, Huhle G (2006) Recombinant human activated protein C upregulates the release of soluble fractalkine from human endothelial cells. *British Journal of Haematology* 133: 550-557

Abstracts

7. Deutscher Interdisziplinärer Kongreß für Intensivmedizin und Notfallmedizin (DIVI) (01.-04.12.2004), Hamburg

Martina Brückmann, Cathleen Engelhardt, Siegfried Lang, Ursula Hoffmann, Claudia Liebetrau, **Adriane Schulze Nahrup**, Jens J. Kaden, Martin Borggreffe, Karl K. Haase, Guenter Huhle (2004) Recombinant human activated protein C upregulates the production of PDGF-BB in human endothelial cells. *Intensivmedizin und Notfallmedizin* 41 (Suppl. 1): Seite I/7. Poster (072)

GTH-Tagung (23.-26.02.2005), Mannheim

Martina Brueckmann, Sarah Horn, Kenji Fukudome, Siegfried Lang, **Adriane Schulze Nahrup**, Ursula Hoffmann, Jens J. Kaden, Karl K. Haase, Martin Borggreffe, Guenter Huhle: Recombinant human activated protein C upregulates cyclooxygenase-2 expression in endothelial cells via binding to endothelial cell protein C receptor and activation of protease-activated receptor-1. *Hämostaseologie* (2005) 25: A16

2. Kongress der deutschen Sepsisgesellschaft (7.-10.09.2005), Weimar

Martina Brueckmann, **Adriane Schulze Nahrup**, Siegfried Lang, Ursula Hoffmann, Thomas Bertsch, Jens J. Kaden, Martin Borggreffe, Guenter Huhle: Recombinant human activated protein C upregulates the release of fractalkine from endothelial cells. *Infection* (2005), Vol 33, Suppl. 1, S. 22

Martina Brueckmann, Ursula Hoffmann, Cathleen Engelhardt, **Adriane Schulze Nahrup**, Kenji Fukudome, Siegfried Lang, Christian Putensen, Martin Borggrefe, Guenter Huhle: PDGF-BB-levels in septic patients are upregulated by rhAPC *via* enhanced endothelial release. *Infection* (2005), Vol. 33, Suppl. 1, S. 22

**18. Jahreskongreß der Society of Intensive Care Medicine (ESICM) (25.-28.09.2005),
Amsterdam**

Martina Brueckmann, **Adriane Schulze Nahrup**, Siegfried Lang, Ursula Hoffmann, Thomas Bertsch, Jens J. Kaden, Martin Borggrefe, Guenter Huhle: Recombinant human activated protein C upregulates the release of fractalkine from endothelial cells. *Intensive Care Medicine* (2005); Vol. 31, Suppl. 1, S. 217

8.2. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Borggreffe, der mir ermöglicht hat, an der von ihm geleiteten I. Medizinischen Klinik der Fakultät für Klinische Medizin Mannheim der Universität Heidelberg, meine Promotionsarbeit anzufertigen.

Dem Team um Frau Dr. Brückmann möchte ich für die Unterstützung im Labor danken. An erster Stelle möchte ich dabei Martina danken, die mit ihrem unermüdlichen Engagement nicht müde wurde mit mir das Thema meiner Promotionsarbeit zu erarbeiten. Danken will ich auch Herrn Dr. Lang, der mich bei der Durchführung der Experimente tatkräftig unterstützt hat. Meinen herzlichen Dank gilt auch den beiden medizinisch technischen Assistentinnen, Frau Liebetau und Frau Burmeister, die eine hervorragende Hilfe bei der Arbeit im Labor waren. Ferner will ich noch Cathleen danken, die mich sehr gut im Labor eingearbeitet hat. Dann möchte ich noch Herrn Hack meinen Dank aussprechen, der mit seinem fundierten Fachwissen über Genarrays mir sehr bei der Durchführung und Auswertung desselbigen geholfen hat.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Roth, der sich nicht scheute, mich als Doktorandin zu betreuen und mir immer sehr freundlich und hilfsbereit zur Seite stand.

Mein ganz besonderer Dank ist an meine Familie gerichtet, die mir ermöglicht hat, meinen Traum von der Veterinärmedizin zu verwirklichen und mich dabei immer aus ganzem Herzen unterstützt hat.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei meiner zweiten Familie bedanken, Dres. Heinrich und Maria-Theresia Terlunen, ihr ward und seid mir immer eine große Stütze und Hilfe.

Und schließlich möchte ich Christian Terlunen danken, der mich immer wieder während meines Promotionsvorhabens angespornt und ermutigt hat.

8.3. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: „Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5164-5



9 783835 951648

