

**Regulation der Thrombomodulin-Expression in
humanen glatten Gefäßmuskelzellen durch
vasodilatierende Prostaglandine (PGI₂, PGE₂) –
Ein neuer, thrombozytenunabhängiger
Mechanismus zur Erklärung der prothrombotischen
Wirkungen von COX-2-Inhibitoren**

Inaugural-Dissertation

zur

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

**vorgelegt von
Kerstin Rabausch
aus Düsseldorf**

**Düsseldorf
2005**

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

Referent: Prof. Dr. Karsten Schrör
Koreferent: Prof. Dr. Hans-Dieter Höltje

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.2005

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildungen
AC	Adenylatzyklase
aPC	Aktiviertes Protein C
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAEC	Koronararterielle Endothelzellen
CASMC	Koronararterielle glatte Gefäßmuskelzellen
CI	Konfidenzintervall
COX	Cyclooxygenase
CRE	<i>cAMP responsive element</i>
CREB	CRE bindendes Protein
CREM	<i>cAMP responsive element modulator</i>
DAG	1,2-Diacylglycerol
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2-desoxy-Ribonucleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
FX (a)	Faktor X (aktivierter)
EC	Endothelzellen
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ETP	Endogenes Thrombin Potential
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FV (a)	Faktor V (aktivierter)
FVIII (a)	Faktor VIII (aktivierter)

FX (a)	Faktor X (aktivierter)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
G-Protein	Guanylnukleotid-bindendes Protein
GPGR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
H ₂ O	Wasser
HCAEC	Humane koronararterielle Endothelzellen
HCASMC	Humane koronararterielle glatte Gefäßmuskelzellen
HEPES	n-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-Ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
hSMC	humane glatte Gefäßmuskelzellen
IBMX	Isobutylmethylxanthin
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IP-R	Prostacyclin-Rezeptor
kDa	kilo Dalton
Kon	Kontrolle
KHK	Koronare Herzkrankheit
M	Molar (mol/l)
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
mM	Millimolar (mmol/l)
μM	Mikromolar (μmol/l)
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
nm	Nanometer
NSAID	Nicht steroidale Antirheumatika
OD	optische Dichte
PAI-1	<i>plasminogen activator inhibitor-1</i>
PAR	<i>protease activated receptor</i>
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PC	Protein C
PDGF-BB	<i>platelet derived growth factor</i> , B-Ketten Homodimer
PG	Prostaglandin
PGI ₂	Prostacyclin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂

PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol 12-myristat 13-Acetat
PPP	Plättchen-armes Plasma
PRP	Plättchen-reiches Plasma
PVDF	Polyvenyliden Difluorid Membran
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SMC	Glatte Gefäßmuskelzellen
sTM	Lösliches Thrombomodulin
TAFI	<i>thrombin activatable fibrinolysis inhibitor</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TF	Tissue Factor (Gewebethromboplastin)
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
TXA ₂	Thromboxan A ₂
UV	Ultraviolett
VS	Vena saphena

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Blutgerinnung	2
1.2.	Thrombomodulin	8
1.2.1.	Thrombomodulin-Struktur	8
1.2.2.	Bedeutung von Thrombomodulin für die Entzündung	10
1.2.3.	Regulation von Thrombomodulin	12
1.3.	Cyclooxygenasen und Eikosanoide	13
1.3.1.	Synthese und Wirkung von Prostaglandinen	13
1.3.2.	COX-2-Expression in der Atherosklerose	18
1.4.	Ziel der Arbeit	19
2.	MATERIAL und METHODEN	20
2.1.	Puffer und Lösungen	20
2.2.	Substanzen	22
2.3.	Antikörper	24
2.4.	Zellkultur	24
2.4.1.	Kultur glatter Gefäßmuskelzellen	25
2.4.2.	Kultur von Endothelzellen	25
2.5.	Präparation und Analyse von RNA	26
2.5.1.	Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Zellen	26
2.5.2.	Quantifizierung der RNA	26
2.6.	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	27
2.6.1.	Für die RT-PCR verwendete Primer	27
2.6.2.	RT-PCR mit Qiagen® One-Step RT-PCR Kit	28
2.6.3.	Densitometrische Auswertung der RT-PCRs	28
2.7.	Präparation und Analyse von Proteinen im Western Blot	29
2.7.1.	Präparation von Proteinen aus humanen Zellen	29
2.7.2.	Auftrennung der Proteine im Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE)	29
2.7.3.	Transfer von Proteinen	29
2.7.4.	Hybridisierung und Detektion von Proteinen	30
2.7.5.	Prüfung auf gleichmäßige Proteinbeladung	30
2.7.6.	Prüfung auf Vollständigkeit des Proteintransfers	30
2.8.	Durchflusszytometrische Analyse von SMC und EC	31
2.9.	Bestimmung des endogenen Thrombinpotentials (ETP)	31
2.10.	Herstellung von gewaschenen Thrombozyten	32

2.11.	Herstellung von Plättchen–armem Plasma (PPP)	33
2.12.	Bestimmung von 6-keto PGF_{1α}	33
2.13.	Bestimmung von löslichem Thrombomodulin im Zellüberstand	33
2.14.	Bestimmung der Thrombomodulin-Oberflächenaktivität	33
2.15.	Morphologische Analyse humaner atherosklerotischer Läsionen	34
2.16.	Metabolische Markierung von Chondroitinsulfat-Seitenketten	35
2.17.	Bestimmung der DNA-Syntheserate	35
2.18.	Statistik	36
3.	ERGEBNISSE	37
3.1.	Einfluss exogener Prostaglandine auf die Thrombomodulin-Expression	37
3.1.1.	Induktion der Thrombomodulin-mRNA-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen	37
3.1.1.1.	Induktion der Thrombomodulin-mRNA-Expression durch Iloprost	37
3.1.1.2.	Regulation der Thrombomodulin-mRNA-Expression durch Phorbol ester und Zytokine im Vergleich zu Iloprost	39
3.1.2.	Thrombomodulin-Protein-Expression	41
3.1.2.1.	Charakterisierung des Thrombomodulin-Proteins	41
3.1.2.2.	Induktion der Thrombomodulin-Protein-Expression durch verschiedene Substanzen	44
3.1.2.3.	Konzentrationsabhängige Induktion der Thrombomodulin-Protein-Expression durch Iloprost und Cicaprost	44
3.1.2.4.	Thrombomodulin-Regulation durch Prostaglandin-Rezeptoren	47
3.1.2.5.	Untersuchungen zum cAMP-/PKA-Signaltransduktionsweg	51
3.1.3.	Funktionelle Bedeutung von Thrombomodulin	53
3.1.3.1.	Funktionelle Auswirkungen der Thrombomodulin-Expression in humanen EC	53
3.1.3.2.	Funktionelle Auswirkungen der Thrombomodulin-Expression in humanen SMC	55
3.2.	Einfluss endogener Prostaglandine auf die Thrombomodulin-Expression	56
3.2.1.	Induktion der COX-2	56
3.2.2.	Funktionelle Konsequenzen einer erhöhten COX-2-Expression	56
3.2.3.	Einfluss endogener Prostaglandine auf die Thrombomodulin-mRNA-Expression	58
3.2.4.	Einfluss endogen gebildeter Prostaglandine auf die TM-Protein-Expression	61
3.2.5.	Einfluss von aktiviertem Protein C (aPC) auf die Thrombinbildung in EC	63
3.2.6.	Einfluss von Thrombomodulin auf das endogene Thrombinpotential SMC	64
3.2.7.	Aktivierung von Protein C	65
3.2.8.	Einfluss von aktivitätsblockierenden Thrombomodulin-Antikörpern auf die DNA-	66

	Synthese	
3.3.	Thrombomodulin-Expression in humanen atherosklerotischen Läsionen	68
3.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse	70
4.	DISKUSSION	72
4.1.	Thrombomodulin-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen	73
4.2.	Untersuchungen zur Signaltransduktion	74
4.3.	Bedeutung endogen gebildeter Prostaglandine für die Thrombomodulin-Expression	78
4.4.	Funktionelle Bedeutung einer erhöhten Thrombomodulin-Expression	81
4.5.	Thrombomodulin- und COX-2-Expression in humanen Atherektomieproben	83
4.6.	Bedeutung von Thrombomodulin für die Therapie mit COX-2-Inhibitoren	85
5.	ZUSAMMENFASSUNG	90
6.	LITERATURVERZEICHNIS	91
7.	VERÖFFENTLICHUNGEN	106
8.	DANKSAGUNG	107
9.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	108
10.	LEBENS LAUF	109

1. EINLEITUNG

Die Atherosklerose und ihre Komplikationen sind für ca. 50% der Todesfälle in Europa, USA und Japan verantwortlich. Ursächlich an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt ist eine Funktionsstörung des Endothels. Durch seine besondere strategische Lage zwischen vorbeiströmendem Blut und Gefäßwand interagiert das Endothel mit Bestandteilen beider Kompartimente. Zu den wichtigsten physiologischen Funktionen der Endothelzellen (EC) gehört die Regulation des Gefäßtonus, die Kontrolle von Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen (SMC), die Kontrolle der Leukozyteninvasion sowie die Aufrechterhaltung eines antithrombotischen und profibrinolytischen Zustands, vermittelt über die Bildung und Freisetzung von Mediatoren, wie Prostacyclin (PGI₂), Prostaglandin E₂ (PGE₂) und Stickstoffmonoxid (NO). Kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, Nikotinkonsum und Diabetes mellitus, gehen mit der Entwicklung einer Endotheldysfunktion einher. Ein Kennzeichen der endothelialen Dysfunktion ist der Verlust der NO-vermittelten Vasodilatation, die bereits in der Frühphase der Atherosklerose oder des Diabetes mellitus nachweisbar ist und auch diagnostischen Wert besitzt. Folge davon ist eine Invasion von Monozyten in die Gefäßwand. Diese differenzieren zu Makrophagen, welche Zytokine und Wachstumsfaktoren produzieren und oxidiertes *low density lipoprotein* (LDL) aufnehmen. SMC der Media werden durch diese Faktoren vom physiologischen kontraktilen in einen sekretorischen Phänotyp konvertiert und zur Migration, Proliferation und Synthese extrazellulärer Matrix angeregt. Folge ist die Entstehung einer atherosklerotischen Plaque mit einem nekrotischen Lipidkern (Ross, 1986; Raines, 1993). Dies geht mit einer Verengung des Gefäßlumens einher. Diese atherosklerotischen Veränderungen sind die Hauptursache für die Entwicklung der koronaren Herzkrankheit, des ischämischen Zerebralinsultes und der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (Masud und Mackenzie, 2003; Viles-Gonzalez et al., 2004). Meist besteht eine stabile und asymptomatische Form des atherosklerotischen Plaques über Jahre bis entweder eine Angina pectoris-Symptomatik aufgrund einer Sauerstoff-Minderversorgung in distal der Stenose gelegenen Gewebearealen oder ein thrombotischer Gefäßverschluss (Myokardinfarkt oder Apoplex) entsteht. Ursache für die thrombotischen Gefäßverschlüsse sind erodierte Plaques oder Plaquerupturen (Ross, 1993). Ein weiterer auslösender Faktor von thrombotischen Gefäßverschlüssen können Gefäßläsionen sein, die durch koronare Interventionen induziert werden (Ip et al., 1991). Dazu zählt die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA),

bei der stenosierte oder thrombotisch verschlossene Koronararterien durch Einführen eines Ballon-Katheters aufgeweitet, bzw. wiedereröffnet werden (Ferns et al., 1992; Mann, 2003). Allerdings werden solche funktionellen Probleme in der Regel durch eine adäquate antithrombotische Begleitmedikation vermindert. Hinzu kommt, dass SMC den prothrombotisch wirkenden Tissue Faktor (TF; Gewebethromboplastin) freisetzen. Kommt dieser in Kontakt mit zirkulierenden Gerinnungsfaktoren, resultiert eine Aktivierung der Gerinnungskaskade über den extrinsischen Weg (Butenas et al., 2001). Demnach entstehen thrombotische Verschlüsse arterieller Gefäße in der Regel durch Störung der Endothelfunktion und Umwandlung der antikoagulatorischen Eigenschaften in eine prokoagulatorische Oberfläche.

1.1. Blutgerinnung

Der menschlichen Körper enthält 60-70 ml Blut pro kg Körpergewicht. Dieses Blutvolumen soll ohne Verluste im Gefäßsystem zirkulieren, d. h. im Falle einer akuten Verletzung auch in der Lage sein, ein „Leck“ möglichst sofort zu schließen. Alle Vorgänge, die dieser Vitalfunktion dienen, werden klassischerweise unter dem Begriff Hämostase zusammengefasst. Hämostase beinhaltet auch die Mechanismen, die zur Aufrechterhaltung der Fluidität und Zirkulation des Blutes beitragen und somit eine Gerinnung innerhalb des Gefäßes verhindern. Fehlregulationen dieser Prozesse führen entweder zu einer Thrombose oder Blutungstendenz. Thrombin, eine Serinprotease, ist das Schlüsselenzym des Gerinnungssystems und ist hauptsächlich bekannt für seine Funktion bei der Regulation der Hämostase und Thrombose (Mann K.G., 1994). Ebenso spielt Thrombin eine wichtige Rolle bei der Wundheilung und pathologischen Veränderungen, wie der Entzündung und Tumorgenese. Neben der zentralen Rolle im Hämostaseprozeß mediiert Thrombin die Freisetzung verschiedener Wachstumsfaktoren, Zytokine und vasoaktiver Substanzen in der Gefäßwand. Man vermutet, dass durch Thrombin Prozesse in der Gefäßwand in Gang gesetzt werden, die sowohl für die Progression der Atherosklerose (Walters et al., 1994) als auch für die Entstehung von Restenosen nach Koronarangioplastien verantwortlich gemacht werden (Ip et al., 1991; Schwartz et al., 1995; Libby und Tanaka, 1997). Zu diesen Prozessen zählt die Initiierung der Proliferation, Migration und Funktionsstörung von Endothelzellen, sowie subendothelial gelegenen Fibroblasten und SMC (Fager, 1995). Die direkte Wirkung von

Thrombin auf Zellen der Gefäßwand wird über Thrombin-Rezeptoren, so genannte Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs), vermittelt. Diese gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) (Coughlin, 2002), von denen mittlerweile 4 Subtypen bekannt sind. (PAR-1, PAR-3 und PAR-4 sind durch Thrombin aktivierbar während, PAR-2 durch andere Proteasen, wie z.B. Trypsin oder FXa aktiviert wird (Coughlin, 2001; Ruf et al., 2003)).

Die lokale Aktivierung der Thrombinbildung erfolgt initial über den extrinsischen Weg der Gerinnungskaskade, der durch das in der Media und Adventitia der Gefäßwand gelegene Membranprotein Gewebethromboplastin/Tissue Faktor (TF) initiiert wird (Wilcox et al., 1989). TF wird neben verschiedenen anderen subendothelial gelegenen und prokoagulatorisch wirkenden Substanzen bei der Ruptur atherosklerotischer Plaques oder bei tiefen Läsionen der Gefäßwand, z.B. durch eine PTCA verursacht, in großen Mengen freigesetzt (Ferns et al., 1992) und aktiviert nachfolgend die extrinsische Gerinnungskaskade (Butenas et al., 2001).

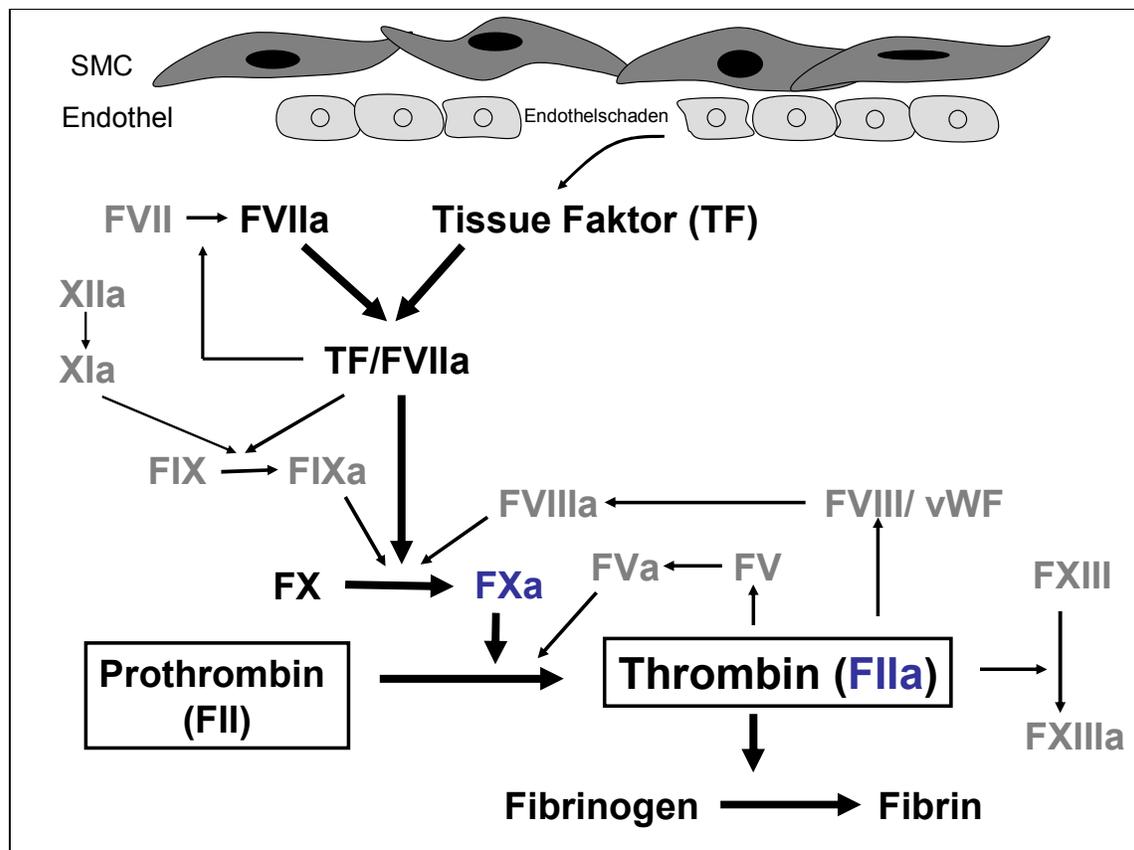


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der intravaskulären Bildung von Thrombin (Weitere Erklärungen siehe Text).

Tissue Faktor bindet an den im Blut zirkulierenden Gerinnungsfaktor VII. Über diese Komplexbindung von TF mit Faktor VIIa werden die Zymoge Faktor IX und Faktor X aktiviert (Lawson und Mann, 1991). Die auf diese Weise gebildete Serinprotease Faktor Xa reicht aus, um in geringem Umfang Thrombin zu bilden, welches dann Plättchen aktiviert und die Pro-Kofaktoren Faktor V und Faktor VIII spaltet und damit die aktiven Koagulationsfaktoren Va und VIIa bildet (Butenas et al., 2001). Faktor VIIa zusammen mit Faktor IXa formt auf der Membranoberfläche von Plättchen, Mikropartikeln, dem Endothel oder anderen Zellen den Tenase-Komplex, der wiederum den Faktor X 50 – 100 –fach stärker aktiviert als der Tissue Faktor / Faktor VIIa-Komplex (Mann et al., 2003). Der nun gebildete Prothrombinasekomplex (Faktor Xa, Va, Kalzium und Phospholipide) katalysiert in großen Mengen die Umwandlung der Prothrombinmoleküle in Thrombin (Mann et al., 1991). Sowohl das extrinsische als auch das intrinsische Gerinnungssystem münden in der Umsetzung von Prothrombin zu Thrombin, welches dann die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen katalysiert, wie auch die Aktivierung der Transglutaminase Faktor XIII (Butenas und Mann, 2002), wodurch der Thrombus an der Gefäßwand fixiert wird.

Werden durch die Ruptur einer atherosklerotischen Plaque oder durch eine Gefäßläsion prokoagulatorisch wirkende Substanzen vermehrt lokal freigesetzt, so kann dies zu einer inadäquaten Antwort des Hämostasesystems und der Bildung eines gefäßokkludierenden Thrombus führen (Mann et al., 2003). Verschiedene Regulationsmechanismen sorgen dafür, dass keine überschießende

Thrombinaktivierung stattfindet und der Hämostaseprozeß auf den Bereich der Gefäßläsion beschränkt bleibt. Antithrombin (AT) ist einer der wichtigsten endogenen Inhibitoren der Blutgerinnung und bindet Thrombin in einem stöchiometrischen Komplex. Die inhibitorische Wirkung des AT richtet sich nicht nur gegen Thrombin, sondern gegen alle wichtigen Gerinnungsfaktoren (Serinproteasen) und entfaltet damit eine hemmende Wirkung auf

vielen Stufen der Gerinnungskaskade. Auch der *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) ist ein

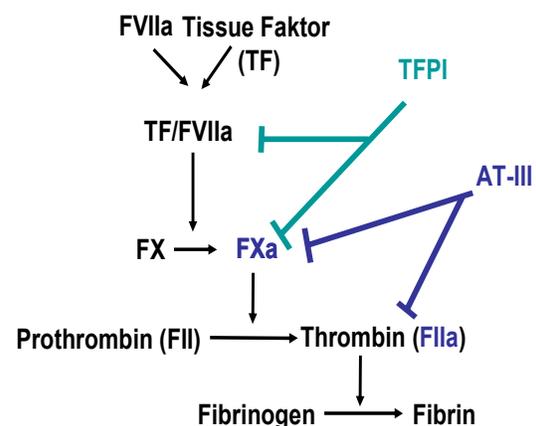


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Interaktion von Antithrombin III (AT-III) und des *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) mit der Thrombinbildung.

Inhibitor der Blutgerinnung (Novotny et al., 1991). Die Hauptziele des TFPI sind der Faktor Xa und der Faktor VIIa-Tissue Faktor-Komplex (Broze, et al., 1988; Girard et al., 1989).

Ein dynamisches Inhibitorsystem wird aktiviert, wenn Thrombin an seinen Kofaktor Thrombomodulin (TM) bindet und Protein C (PC) aktiviert (aPC) (Esmon, 2000). Dem Vitamin K-abhängigen PC, welches als Zymogen im Blut zirkuliert, kommt dabei eine Schlüsselfunktion zu. Thrombin bindet mit hoher Affinität (Dissoziationskonstante ca. 0,5-5 nM) an TM. Während Thrombin auch allein PC aktivieren kann, ist die PC-Aktivierung durch an TM-gebundenes Thrombin um den Faktor 1000 erhöht (Owen und Esmon, 1981). Durch Bildung dieses Komplexes erfährt Thrombin eine Konformationsänderung und wird von einem prokoagulatorischen in ein antikoagulatorisches Enzym umgewandelt. Diese Bindung, führt zu einem schnellen Entfernen des prokoagulatorischen Thrombins aus der Zirkulation (Esmon, 2002) und damit zu einem antithrombotischen Effekt. Außerdem wird an TM gebundenes Thrombin ca. 20-fach schneller von Plasma-Proteaseinhibitoren inaktiviert. Die Bildung des Thrombin/TM-Komplexes führt zu einer Blockierung der aktiven Struktur von Thrombin und damit zu einer Änderung der Substratspezifität (Esmon, 1989; Esmon, 1995; Esmon, 2002). Auf diese Weise werden alle prokoagulatorischen Aktivitäten des Thrombins, wie die Spaltung von Fibrinogen, die Aktivierung von Faktor V (Esmon et al., 1982), die Aktivierung von Thrombozyten (Esmon et al., 1983), sowie die Aktivierung des Gerinnungsfaktors XIII verhindert (Polgar et al., 1986). aPC wiederum inaktiviert proteolytisch die Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa, die wesentlich an der Thrombinbildung beteiligt sind. Demnach ist die Interaktion von Thrombin mit TM auf der Endothelzelloberfläche nicht nur mit einem Verlust der Thrombin-Aktivität assoziiert, sondern inhibiert zusätzlich noch einen *feedback*-Mechanismus, der zu einer Inhibierung der Thrombinbildung führt. Somit beruht die antikoagulatorische Aktivität von TM einerseits auf dem direkten Effekt, die prokoagulatorische Wirkung von Thrombin zu inhibieren und andererseits auf der Funktion als potenter Kofaktor der Thrombin-abhängigen Aktivierung von PC. Hinsichtlich der Thrombin-Fibrinogen Reaktion wirkt TM als kompetitiver Inhibitor, weil durch die Bindung von Thrombin an TM die Bindungsstelle des Thrombins für Fibrinogen blockiert wird (Hofsteenge und Stone, 1987).

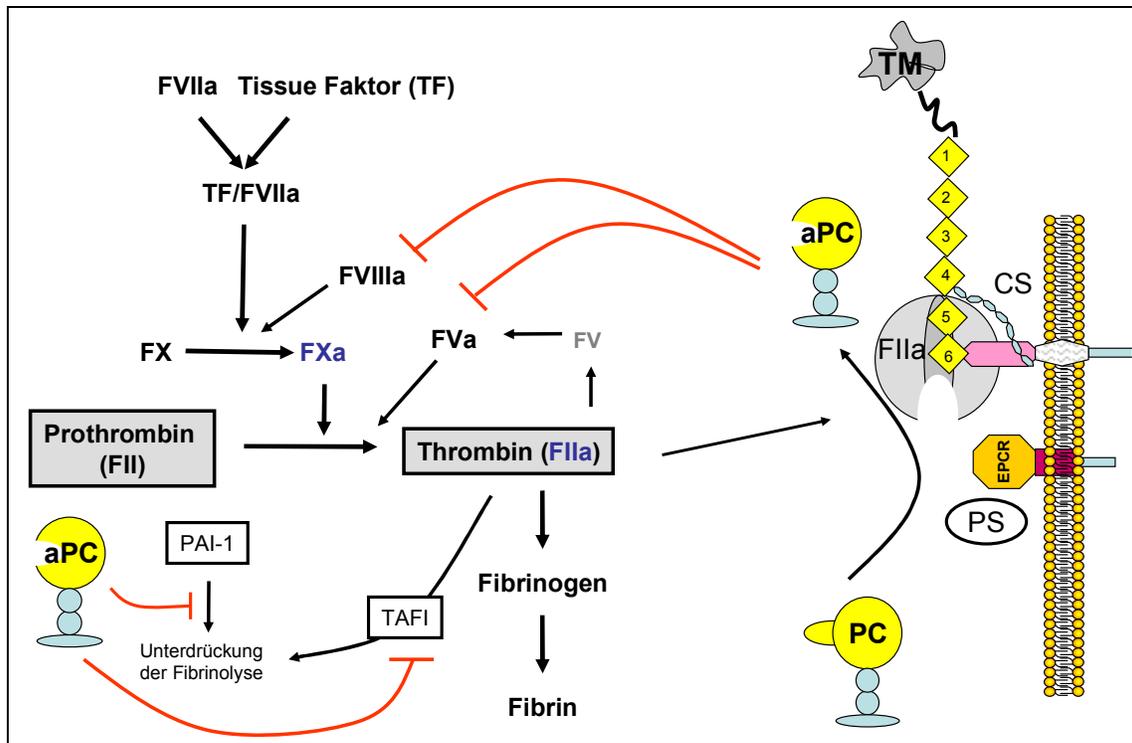


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Interaktion des TM/PC-Systems mit der intravaskulären Thrombinbildung. (Weitere Erklärungen siehe Text)

Interessanterweise scheint die Interaktion von TM mit Koagulationsenzymen nicht nur auf Thrombin beschränkt zu sein. Auch die Faktor Xa-abhängige Aktivierung von Prothrombin wird durch den endothelialen Rezeptor inhibiert, wahrscheinlich durch direkte Bindung von Faktor Xa an TM (Thompson und Salem, 1986; Thompson und Salem, 1987).

Thrombin *activatable fibrinolysis inhibitor* (TAFI) ist ein Carboxy-Peptidase B Proenzym, und hemmt nach Aktivierung durch Thrombin die Fibrinolyse (Bajzar et al., 1996). TM stimuliert nicht nur die Aktivierung von PC, sondern auch die von TAFI, während aPC die Aktivität von TAFI durch Hemmung der Thrombinbildung hemmt. Die Regulation der Fibrinolyse im Plasma durch TAFI und PC ist abhängig von der TM-Konzentration. Hohe Konzentrationen an TM resultieren in einer Induktion der Fibrinolyse, niedrige Konzentrationen dagegen haben einen inhibitorischen Effekt (Mosnier et al., 2001). Sowohl die Aktivierung von PC als auch von TAFI ist erhöht, wenn Thrombin an TM gebunden ist.

Das Protein C-System beinhaltet verschiedene Proteine, die an der Aktivierung von PC beteiligt sind: Proteine, die die proteolytische Aktivität von aPC unterstützen und solche, die die Aktivität von aPC inhibieren. Die Aktivierung von PC auf der Endothelzelloberfläche durch den Thrombin-TM-Komplex wird durch den endothelialer PC Rezeptor (EPCR), der an

die Gla-Domäne des PC bindet, unterstützt und verstärkt diese in vivo um den Faktor 20 (Taylor, et al., 2001; Dahlback und Villoutreix, 2003). Die Halbwertszeit von zirkulierendem aPC ist mit ca. 20 min. relativ lang, was bedeuten könnte, dass aPC auch systemisch antikoagulatorische Funktionen ausübt. Zwei Kofaktoren, das Vitamin K-abhängige Protein S (PS) und die nicht aktivierte Form des Faktors V (FV) verstärken die antikoagulatorische Aktivität von aPC. PS ist entscheidend an der Inaktivierung von FVa beteiligt, während die Regulation von Faktor VIIIa in dem Tenase-Komplex die synergistische Beteiligung von PS und FV erfordert (Nicolaes und Dahlback, 2002). Neben diesen Mechanismen zur Verstärkung der PC-Aktivität gibt es auch inhibitorische Mechanismen. So kann aPC durch Protease-Inhibitoren wie dem PC-Inhibitor und α 1-Antitrypsin inhibiert werden (Dahlback und Villoutreix, 2003).

Dieses natürliche antikoagulatorische System, das PC-System, stellt eine spezifische und effiziente Kontrolle der Blutgerinnung dar. Dieser Signalweg dient als ein so genanntes *on demand* antikoagulatorisches System und wird durch inflammatorische Mediatoren reguliert. Es umfasst sowohl zirkulierende als auch membrangebundene Proteine. Eine Dysfunktion dieses Systems ist relativ häufig und mit einem erhöhten venösen und wahrscheinlich auch arteriellen Thromboserisiko assoziiert (Griffin et al., 1981; Owen und Esmon, 1981; Broekmans et al., 1983).

Die besondere Bedeutung des aPC bei der Hemmung der Blutgerinnung wird auch an dessen Wirkung bei der Sepsis deutlich. Septische Zustandsbilder sind häufig mit einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) assoziiert. Aus dem Zusammenhang zwischen Sepsis und Gerinnungsaktivierung, sowie Erkenntnissen über die Rolle von Gerinnungsaktivierung und Mikrozirkulationsstörungen bei der Genese des Sepsis-induzierten Multiorganversagens, entstand das Konzept, dass eine Hemmung von Gerinnungsvorgängen zu einer Verbesserung der klinischen Prognose bei Sepsis führen kann. Zentraler Regulator ist das Thrombin, dessen Hemmung durch (a)PC somit einen effiziente therapeutische Behandlung der Sepsis darstellt und mittlerweile für diese Indikation zugelassen ist.

Das Thrombinmolekül, das eine zentrale Rolle im Hämostaseprozess spielt, stellt einen entscheidenden Ansatzpunkt auch für die Pharmakotherapie zur Verhinderung thrombotischer Komplikationen dar (Chesebro et al., 1991; Mann et al., 2003). So werden derzeit AT-abhängige Heparine (unfraktioniert und fraktioniert) (Hirsh et al., 2001; Alban et al., 2002), Hirudine (Lefkovits und Topol, 1994), Faktor Xa-Antagonisten und auch synthetische

Thrombininhibitoren zur Inhibierung der prokoagulatorischen Wirkungen des Thrombins eingesetzt. Neben den Wirkstoffen, die direkt mit den Gerinnungsfaktoren interagieren, greifen die Vitamin-K-Antagonisten in deren Biosynthese ein. Diese hemmen die Generierung der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren (Faktor X, IX, VII, II).

1.2. Thrombomodulin

Herz-Kreislaufkrankungen aufgrund von Gefäßveränderungen sind oft mit einer erhöhten Thromboseneigung assoziiert. Daher war für diese Arbeit das antithrombotische Thrombomodulin/Protein C-System von besonderem Interesse. TM, ein endothelialer Rezeptor für Thrombin, wandelt Thrombin von einem prokoagulatorischen in ein antikoagulatorisches Enzym um. Diese Funktionsänderung des Thrombins stellt damit eine Schlüsselreaktion im PC-System dar, die auf einer durch TM induzierten Konformationsänderung basiert.

1.2.1. Thrombomodulin-Struktur

Die funktionellen und strukturellen Eigenschaften des TM werden daher im Folgenden näher erläutert. TM spielt eine kritische Rolle bei der natürlichen Hemmung der Blutgerinnung durch seine Kofaktoraktivität in der Thrombin-katalysierten Aktivierung von Protein C (PC). TM, auch als Fetomodulin bekannt, ist ein monomeres Typ-1 transmembranäres Protein und dient als endothelialer Zelloberflächen-Rezeptor für Thrombin (Esmon und Owen, 1981). TM besteht aus mehreren Domänen, einer Lektin-ähnlichen NH₂-terminalen Domäne, gefolgt von einem hydrophoben Segment, sechs hintereinander folgenden *epidermal growth factor* (EGF)-ähnlichen Domänen, einer Domäne für O-glykosidische Anknüpfungsstellen (Serin/Threoninreiche Region), einer transmembranären Domäne und einem kurzen zytoplasmatischen Teil (Fuentes-Prior et al., 2000) (Abb. 1-4).

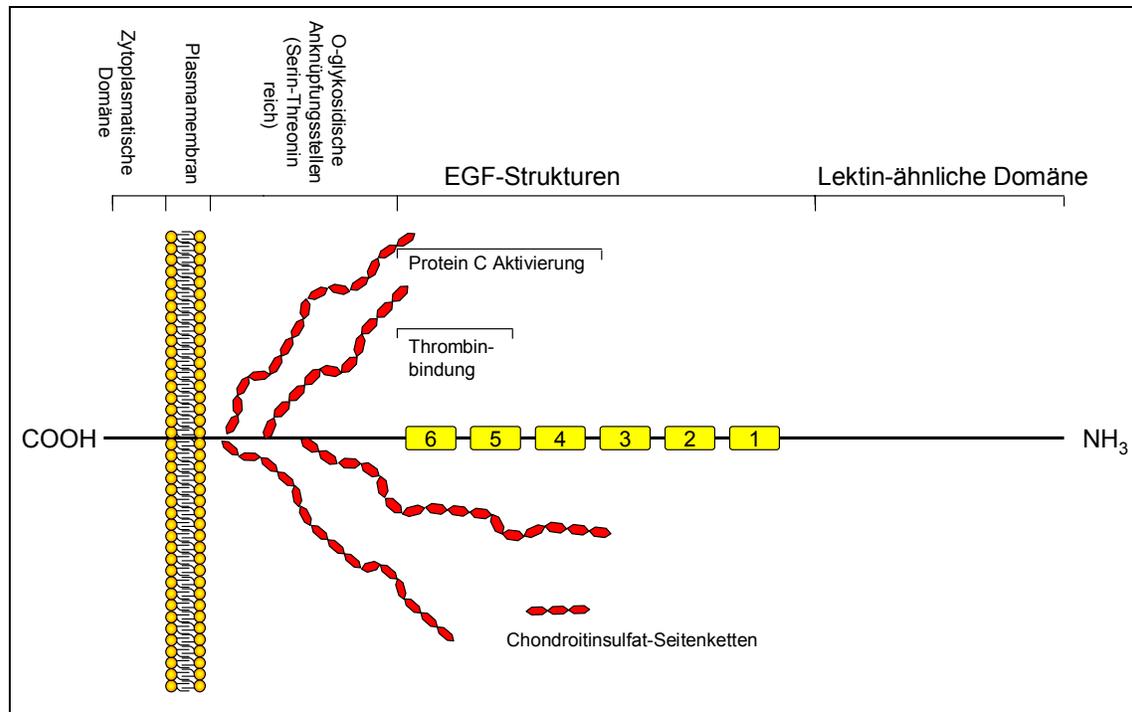


Abbildung 1-4: Schematische Struktur von Thrombomodulin. Im Zellinneren ist eine kurze zytoplasmatische Domäne vorhanden, gefolgt von einer transmembranären Domäne. Eine Serin/Threonin-reiche Domäne, glykosyliert mit Chondroitinsulfat (CS), schließt sich an, welche die Thrombinaffinität erhöht und mit einer Anion-bindenden Struktur des Thrombin interagiert. Anschließend folgen sechs EGF-ähnliche Strukturen und eine Lektin-ähnliche Domäne. EGF4-6 sind verantwortlich für die Kofaktorfunktion der Thrombin-induzierten Aktivierung von PC.

Die EGF-Domänen 5 und 6 des TM sind hauptsächlich für die Bindungsaffinität von Thrombin verantwortlich (Kurosawa et al., 1987). Die Glykosylierung der O-glykosidischen Anknüpfungsstellen (Serin/Threonin) mit Chondroitinsulfat-Seitenketten (Bourin et al., 1988; Bourin et al., 1990) unterstützt nicht nur die Bindung von Thrombin an TM, sondern verstärkt auch die Reaktion von Thrombin mit Antithrombin (Preissner et al., 1987; Bourin und Lindahl, 1990; Parkinson et al., 1992;). Diese Chondroitinsulfat-Seitenketten spielen außerdem eine bedeutende Rolle für die Kinetik der PC-Aktivierung des Thrombin/TM-Komplexes (Koyama et al., 1991a; Koyama et al., 1991b; Parkinson et al., 1992).

Neben der Lokalisation in der Plasmamembran sind Spaltprodukte des TM auch im Plasma vorhanden, sogenanntes lösliches TM (sTM). Diese Spaltprodukte des membranständigen TM haben ebenso antikoagulatorische wie auch antifibrinolytische Eigenschaften (Solis et al., 1994; Bajzar et al., 1998). Prospektive Studien haben gezeigt, dass das Risiko für koronarvaskuläre Ereignisse bei Patienten mit niedrigen Plasma-sTM-Spiegeln deutlich

erhöht ist (Wu und Matijevic-Aleksic, 2000). Somit kann der sTM-Spiegel auch als diagnostischer Parameter verwendet werden. Eine Besonderheit weist das TM-Gen auf. Dieses enthält keine Introns, sodass das funktionell aktive Genprodukt ohne weitere *splicing*-Mechanismen synthetisiert werden kann. Das humane TM Gen ist auf Chromosom 20 im Abschnitt p12-cen lokalisiert (Wen, 1987). Die cDNA ist 1725 bp lang und kodiert ein Protein aus 575 Aminosäuren.

1.2.3. Bedeutung von Thrombomodulin für die Entzündung

Neuere Studien konnten zeigen, dass TM unabhängig und abhängig von Thrombin und PC auch biologische Systeme außer dem Koagulationssystem beeinflusst. Schon lange wurde vermutet, dass die Koagulation eine modulatorische Funktion auf die Entzündungsmechanismen hat, aber erst kürzlich konnten molekulare Quervernetzungen nachgewiesen werden (Esmon et al., 1999). TM als vaskulärer endothelialer Zelloberflächen-Rezeptor beeinflusst das klinisch relevante PC-System, welches wiederum eine Rolle bei Entzündungsreaktionen, Abnormalitäten in der fetalen Entwicklung, Regulation der Zellproliferation und der Tumorgenese spielt. Die adenovirale Überexpression von TM im Kaninchen führte nicht nur zu einer verminderten Thromboseneigung, sondern reduzierte auch lokal die Infiltration der arteriellen Gefäßwand durch Granulozyten und Makrophagen. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass TM einen inhibitorischen Einfluss auf die Entzündung hat (Waugh et al., 1999; Waugh et al., 2000). Die Gabe von rekombinantem TM in einem Tiermodell konnte außerdem die Auswirkungen einer thrombotischen Glomerulonephritis reduzieren (Ikeguchi et al., 2002).

Welche funktionellen Eigenschaften besitzt TM, die zur Modulation von Entzündungsreaktionen führen? Neben der Aktivierung von TAFI kann TM die Entzündung durch die Aktivierung von PC beeinflussen. Auch die Bindung von Thrombin mit all seinen proinflammatorischen Wirkungen trägt zu dem antiinflammatorischen Effekt von TM bei. In Pavianen konnte aPC die durch *Escherichia coli* (*E. coli*) induzierte Sepsis verhindern (Esmon et al., 1991; Taylor, et al., 1991). Diese experimentellen Ergebnisse konnten in der PROWESS-Studie klinisch bestätigt werden. Es wurde gezeigt, dass rekombinantes aPC versus Placebo-Verabreichung die Mortalität von Patienten mit einer schweren Sepsis signifikant senken konnte (Bernard et al., 2001). Die vielfältigen Wirkungen von aPC auf

Endothelzellen werden zum Teil über *protease activated receptors* (PAR) vermittelt (Riewald et al., 2002). Darin eingeschlossen ist die Inhibierung der TF-Expression und die Hemmung der Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α)-Bildung durch Monozyten und Makrophagen (Grey et al., 1998), die Unterdrückung der Nuclear factor- κ B Expression, die Hemmung der Signaltransduktion von Zytokinen und die Interferenz mit der TNF- α -induzierten Aufregulation von Leukozytenadhäsions-Molekülen auf der Zelloberfläche, wodurch die Leukozyten-Akkumulation verhindert werden kann (Murakami et al., 1996). Außerdem hat aPC einen protektiven Effekt auf das Gefäßsystem, indem es die p53-medierte endotheliale Apoptose hemmt (Cheng et al., 2003). TAFI inaktiviert zudem den proinflammatorischen Mediator Bradykinin und den Integrin-Liganden Osteopontin (Myles et al., 2003). Transgene Mäuse, denen die N-terminale Lektin-ähnliche Domäne des TM fehlt, zeigen reduzierte antiinflammatorische Eigenschaften (Conway et al., 2002). Nach Endotoxin-Exposition zeigten diese Mäuse eine geringere Überlebensrate und akkumulierten mehr neutrophile Granulozyten in ihren Lungen. Interessanterweise zeigte diese Deletion keine reduzierte PC-Aktivierung, was darauf hindeutet, dass diese antiinflammatorischen Funktionen des TM unabhängig von aPC vermittelt werden. Auf diese Weise wirkt TM durch die Thrombin-vermittelte Aktivierung von PC, Thrombosen, Entzündungen und Apoptose entgegen. Das bedeutet, dass TM eine zentrale Rolle nicht nur in der Regulation der Hämostase, sondern auch bei der Modulation von Entzündungsreaktionen spielt und damit ein Bindeglied zwischen diesen beiden Prozessen darstellt.

Eine weitere Funktion des Thrombin-TM-Komplex ist die Reduktion der PAR1 vermittelten Proliferation von SMC und Endothelzellen (Freedman, 2001). Durch Überexpression von TM in SMC konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der Proliferationshemmung direkt mit der TM-Konzentration korrelierte (Grinnell und Berg, 1996). Auch der Zusatz von rekombinantem TM konnte die Thrombin-induzierte Proliferation signifikant hemmen (Li et al., 2000).

1.2.4. Regulation von Thrombomodulin

TM wird konstitutiv auf der Oberfläche von Endothelzellen (EC) exprimiert (Esmon, 1989). Auch die Expression von TM in Monocyten (Grey et al., 1998), Fibroblasten (Dittman et al., 1994), und Plättchen (Dittman et al., 1988) ist in der Literatur beschrieben. Glatte Gefäßmuskelzellen gesunder Gefäße exprimieren in der Regel kein TM (Esmon und Owen, 1981). Zahlreiche Faktoren sind bekannt, die die Expression von TM in EC regulieren. Retinolsäure (Weiler-Guettler et al., 1992; Horie et al., 2001), Thrombin (Archipoff et al., 1991), vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF), Plättchen-Faktor 4 (Dudek et al., 1997) und Substanzen, die die cAMP-Konzentration erhöhen (Hirokawa und Aoki, 1991; Tazawa et al., 1994b), induzieren die TM-Expression in EC. Im Gegensatz dazu vermindern beispielsweise Endotoxine (Moore et al., 1987) und Zytokine wie Interleukin-1 β (Hirokawa und Aoki, 1991), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (Maruyama et al., 1991) und *transforming growth factor* β TGF- β (Ohji et al., 1995) die TM-Expression. Prostacyclin und Beraprost, die beide den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen, induzierten ebenfalls die TM-Expression auf der Zelloberfläche humaner EC (Kainoh et al., 1991). Wie TM in humanen glatten Gefäßmuskelzellen reguliert wird, ist bislang noch nicht systematisch untersucht. Erst kürzlich konnten Arbeiten aus dem eigenen Labor eine signifikante Aufregulation der TM-Expression durch Iloprost in humanen SMC zeigen (Meyer-Kirchrath et al., 2004). Meyer-Kirchrath et al. identifizierten differenziell exprimierte Gene unter dem Einfluss von Iloprost in humanen SMC in einer vergleichenden Genexpressions-Analyse. Der Nachweis einer Induktion von TM in SMC um den Faktor 6 war die Grundlage für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche. Die cAMP-abhängige Aufregulation von TM in bovine SMC (Soff et al., 1991) und SMC der Ratte (Traynor et al., 1995) stehen ebenfalls im Einklang mit der Iloprost-induzierten Aufregulation von TM. Somit kommt dem cAMP eine bedeutende Rolle in der TM-Regulation zu (Hirokawa und Aoki, 1991). Die Bedeutung der TM-Expression in SMC ist bislang nicht geklärt. In gesunden Gefäßen sind SMC durch die Endothelzellen von den zirkulierenden Blutbestandteilen abgeschirmt und kommen nicht in Kontakt mit den Faktoren der Gerinnungskaskade und deren Zymogenen. Anders ist dies im Falle einer Endothelzellverletzung, die beispielsweise nach der zunehmend angewendeten perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) bei der Therapie von akuten Myokardischämien. Unter diesen Umständen könnte die TM-Expression in SMC bedeutsam sein und damit eine mögliche Zielstruktur für therapeutische Interventionen darstellen.

1.3. Cyclooxygenasen und Eikosanoide

1.3.1. Synthese und Wirkung von Prostaglandinen

Seit Anfang der 90-er Jahre ist bekannt, dass zwei Isoformen der Cyclooxygenase (COX) existieren: COX-1 und COX-2 (Xi et al., 1991). Sie werden von verschiedenen Genen kodiert und unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Gewebeverteilung und Expressionsregulation. COX-1 wird konstitutiv unter anderem in der Niere, im Magen, in Thrombozyten und im Gefäßendothel exprimiert und kann als so genanntes *house-keeping gene* eine schnelle physiologische Adaption einleiten (Otto und Smith, 1995). Die COX-2 wird in den meisten Geweben nicht konstitutiv exprimiert, ist aber durch unterschiedliche Stimuli induzierbar, wie z.B. durch inflammatorische Zytokine (Mitchell JA, 1994), Wachstumsfaktoren (DeWitt, 1993), Phorbolster (Kujubu, 1991) und Endotoxine (Lee, 1992). Aufgrund der Induzierbarkeit durch mitogene und inflammatorische Reize spielt die COX-2 vor allem bei entzündlichen Prozessen und bei der Mitogenese eine wichtige Rolle (Murata T, 1997). Die Expression der COX-2 kann durch eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen, wie dem Proteinkinase A und C-Weg, wie auch durch Tyrosinkinase induziert werden. Im Magen (Zimmermann et al., 1998), im ZNS und in der Niere ist die COX-2 jedoch auch konstitutiv exprimiert.

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren dienen im Organismus als Vorstufe einer Vielzahl reaktiver Botenstoffe, die sich von der Arachidonsäure ableiten. Unter dem Begriff Eikosanoide werden Produkte der Arachidonsäure (all-cis-5,8,11,14-Eikosatetraensäure) zusammengefasst. Die Arachidonsäure wird unter Einwirkung von Phospholipase A₂ aus der Zellmembran freigesetzt und kann über die COX und Lipoxygenasen weiter verstoffwechselt werden. Die Cyclooxygenasen katalysieren zwei Reaktionen, die die Arachidonsäure über Prostaglandin (PG)G₂ in PGH₂ überführen. PGH₂ kann nun von nachgeschalteten Synthesen zell- bzw. gewebespezifisch zu den Prostaglandinen Prostacyclin (Prostaglandin I₂, PGI₂), PGD₂, PGE₂, PGF_{2α} und zu Thromboxan A₂ (TXA₂) umgewandelt werden (Samuelsson et al., 1975). TXA₂, das durch die TXA₂-Synthase im Thrombozyten gebildet wird, ist ein Vasokonstriktor und induziert die Plättchenaggregation

Prostacyclin (PGI₂) ist das Hauptprodukt des Arachidonsäure-Stoffwechsels im Endothel (Moncada et al., 1976; Schönbeck et al., 1999). Das Enzym COX oder Prostaglandin H-Synthase ist das Schlüsselenzym und auch der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der

Synthese von Prostaglandinen (Otto und Smith, 1995; Vane und Botting, 1995). PGI₂ ist der direkte Gegenspieler von TXA₂ und gilt als der potenteste endogene Inhibitor der Plättchenaggregation (Vane und Botting, 1995). Darüber hinaus hemmt PGI₂ die Proliferation und Migration von SMC (Schrör and Weber, 1997) und trägt so zur Erhaltung eines ruhenden, kontraktiven Phänotyps von SMC bei. Daher kann PGI₂ als wichtiger Gegenspieler des Thrombins im kardiovaskulären System angesehen werden (Schrör K, 1997; Schrör, 2004). Hinsichtlich dieser Thematik sind einige Arbeiten der Arbeitsgruppe um FitzGerald interessant. In einem Maus-Modell konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass die Proliferation vaskulärer SMC und die Thrombozytenaktivierung, induziert durch eine Gefäßverletzung, in Prostacyclin (IP)-Rezeptor defizienten Mäusen erhöht war. Durch gleichzeitige Thromboxan-Rezeptor Defizienz konnte dieser Effekt wieder aufgehoben werden (Cheng et al., 2002). Dies bedeutet, dass eine fehlende PGI₂-Wirkung bei gleichzeitig ungehemmter TXA₂-Wirkung zu einer erhöhten Thrombozytenaktivierung führt, und damit zu einem erhöhten Thromboserisiko. Ebenso wurden die atheroprotektiven Effekte einer endogenen PGI₂-Synthese durch erhöhte COX-2-Expression in weiblichen IP-Rezeptor-defizienten Mäusen aufgehoben (Egan et al., 2004). Interessant für die vorliegende Arbeit ist im Besonderen die Frage, ob PGI₂ neben der Hemmung der Thrombozytenaggregation auch einen Effekt auf die plasmatische Gerinnung, möglicherweise über eine Modulation der TM-Expression, hat.

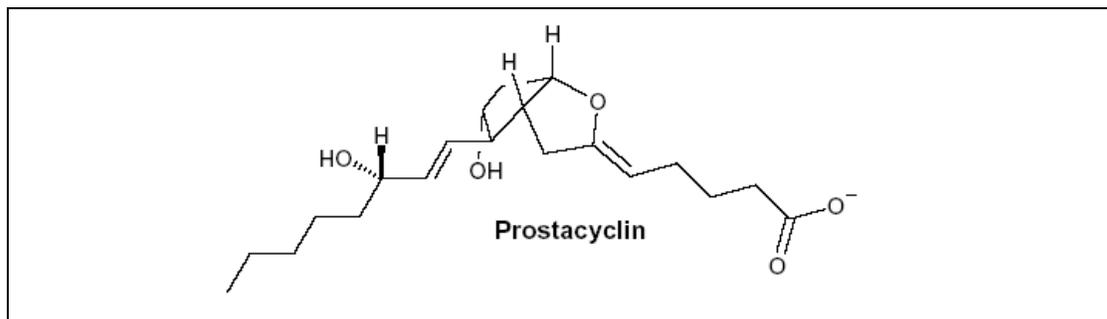


Abbildung 1-5: Struktur von Prostacyclin.

PGI₂ ist jedoch durch seine Vinylotherpartialstruktur sehr instabil und wird schnell zu dem biologisch inaktiven 6-keto-PGF_{1α} hydrolysiert (Schrör, 1984, Negishi et al., 1993). Wegen der potentiellen therapeutischen Bedeutung wurden chemisch stabile Analoga entwickelt, die für experimentelle Arbeiten und in der klinischen Anwendung eingesetzt werden. Dazu zählen unter anderem Cicaprost (K_D: 10 nM) (Müller et al., 1984) und Iloprost (K_D: 11 nM) (Schrör et al., 1981; Schrör, 1984; Narumiya et al., 1999).

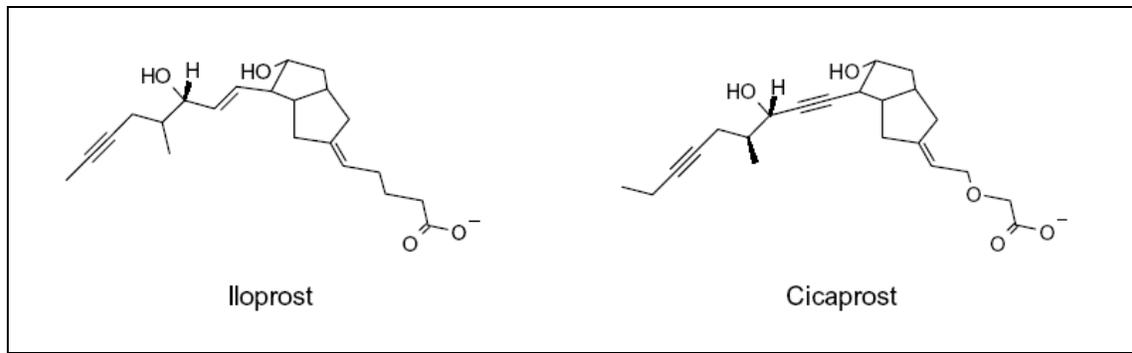


Abbildung 1-6: Struktur chemisch stabiler Analoga des Prostacyclins.

Die zellulären Wirkmechanismen des PGI_2 sind gut untersucht: PGI_2 übt seine physiologische Wirkung über spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), die IP-Rezeptoren aus, die in der Plasmamembran lokalisiert sind. Nach Aktivierung des Rezeptors durch den Agonisten koppeln die PG-Rezeptoren an Guanosintriphosphat (GTP)-bindende Proteine (G-Proteine). Im vaskulären System kommt es nach der Bindung an den IP-Rezeptor zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase. Diese setzt ATP zu cAMP um und erhöht so die intrazelluläre cAMP-Konzentration (Oka et al., 1993). Nachfolgend kommt es zu einer Aktivierung des PKA-Signaltransduktionsweges, der die verschiedenen vasoprotektiven Effekte steuert. Die aktivierte PKA phosphoryliert verschiedene Proteine oder Genexpressionsfaktoren, wie das CREB-Protein (*cAMP-response Element-binding Protein*). In einigen nicht vaskulären Zelllinien wurde auch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Aktivierung des PGI_2 -Rezeptors beschrieben. Daher ist auch eine Kopplung an ein weiteres trimeres G-Protein (G_q) zu vermuten (Schwaner et al., 1992; Oka et al., 1993). Durch Aktivierung des G_q -gekoppelten-Rezeptors wird die Phospholipase C (PLC_β) aktiviert. Daraufhin wird Phosphatidylinositol-bis-Phosphat (PIP_2) in Inositol-tri-Phosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) gespalten. IP_3 diffundiert in das Zytosol und bindet an IP_3 -abhängige Ca^{2+} -Kanäle der Membran des endoplasmatischen Retikulums, was eine Ca^{2+} -Ausschüttung bewirkt. Aktivierung der PKC durch DAG führt zu einem Anstieg der Transkription spezifischer Gene durch Phosphorylierung verschiedener Zielproteine. Bei hohen Prostacyclin-Konzentrationen wurde im Thymus auch eine Stimulation des PLC-Weges gezeigt (Namba et al., 1994). Dies würde auch die Beobachtung vasokonstriktorischer Effekte bei höheren Prostacyclin-Konzentrationen erklären (Schrör und Verheggen, 1988).

Bislang wurde angenommen, dass die antithrombotischen Effekte des PGI_2 ausschließlich auf dessen inhibitorischer Wirkung auf die Plättchenfunktion beruhen. Effekte auf die plasmatische Gerinnung sind bisher nicht beschrieben worden. Wie jedoch eingangs erwähnt,

wird TM durch cAMP und cAMP-erhöhende Substanzen induziert. Auch Iloprost induzierte die TM-Gen-Expression in humanen SMC (Meyer-Kirchrath et al., 2004). Daher ist die Untersuchung des Einflusses von PGI₂ auf die TM-Expression von großem Interesse und könnte eine Verbindung zwischen dem antiaggregatorisch wirkenden PGI₂ und der plasmatischen Gerinnung herstellen.

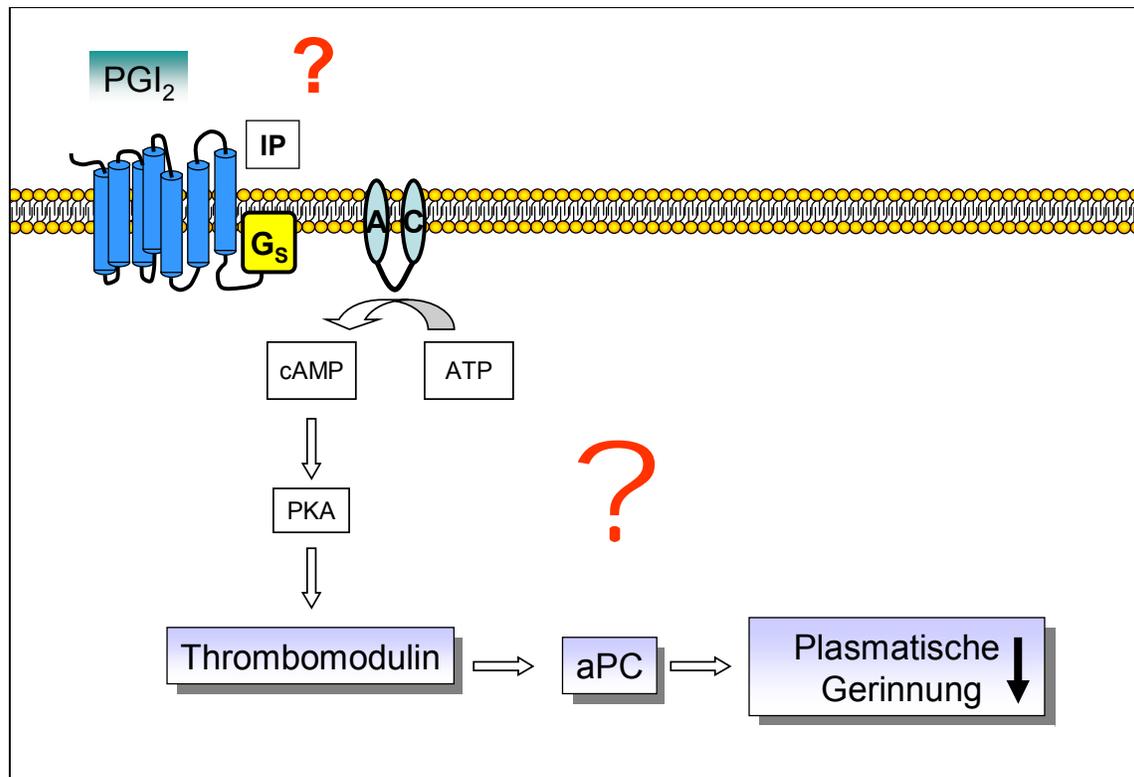


Abbildung 1-7: Mögliche Beeinflussung des TM/PC-Systems durch Prostacyclin und den IP-Rezeptor.

PGE₂ ist neben PGI₂ das Hauptprodukt der Arachidonsäure-Peroxidation im vaskulären System. Charakteristisch für PGE₂ sind seine gegensätzlichen Effekte in einer Vielzahl von Geweben und Zellen, die verbreitete Verteilung seiner Rezeptoren im Organismus und die Existenz mehrerer Rezeptor-Subtypen. PGE₂ kann eine Kontraktion oder Relaxation von vaskulären und nichtvaskulären glatten Muskeln verursachen, die Sekretion von Neurotransmittern und Hormonen stimulieren oder supprimieren, die Vasopressin-induzierte Natrium- und Wasserreabsorption reduzieren und die renale tubuläre Na⁺-Reabsorption steigern. Diese diversen und teilweise gegensätzlichen Wirkungen von PGE₂ sind auf PGE-Rezeptor-Subtypen zurückzuführen, die an unterschiedliche Signaltransduktionewege gekoppelt sind. Bisher sind vier unterschiedliche EP-Rezeptor-Subtypen bekannt: EP₁, EP₂, EP₃, EP₄ bekannt (Coleman et al., 1994).

Eicosanoid	Rezeptor	Agonist	Antagonist	<i>second messenger/</i> Signaltransduktion
PGE₂	EP ₁	Iloprost Sulproston	SC-19220 AH 6809 SC 51089	IP/DAG↑ Kontraktion
	EP ₂	Butaprost AH 13205		cAMP↑ Relaxation
	EP ₃ (4 Splicevarianten)	MB 28767 Sulproston SC46275		cAMP↓
	EP ₄	ONO-AE1-329	AH 23848	cAMP↑ Relaxation

Tab. 1-1: Wirkung von PGE₂ auf die unterschiedlichen EP-Rezeptoren.

Die PG-Rezeptoren können aufgrund unterschiedlicher biologischer Reaktionseffekte unterteilt werden in:

- Die relaxierenden Rezeptoren (IP-, DP-, EP₂ und EP₄-Rezeptoren). Diese vermitteln über eine Gs-Kopplung einen Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels. Nachfolgend kommt es zu einer Aktivierung des PKA-Signaltransduktionsweges.
- Die kontrahierenden Rezeptoren (TP-, FP- und EP₁-Rezeptoren). Diese koppeln an Gq-Proteine und induzieren eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) (Shenker A, 1991). Es werden sekundäre Botenstoffe synthetisiert, wie cAMP, Ca²⁺-Ionen, Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃), welche die Aktivität bestimmter Protein-Kinasen (z.B. Proteinkinase A, Proteinkinase C) steuern und definierte zelluläre Antworten auslösen. Der Anstieg des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels führt zu einer Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur.
- Die inhibitorischen Rezeptoren (EP₃-Rezeptor). Durch Gi-Kopplung induzieren sie eine Verminderung des intrazellulären cAMP-Gehalts, wo durch die cAMP-medierte Relaxation der Gefäßmuskulatur inhibiert wird (Narumiya et al., 1999).

1.3.2. COX-2-Expression in der Atherosklerose

Heute zählt die Atherosklerose zu den chronisch entzündlichen Erkrankungen, da die zellulären Veränderungen zahlreiche Gemeinsamkeiten mit anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie z.B. der rheumatoiden Arthritis aufweisen (Ross, 1999). Das zentrale Geschehen bei der Entstehung von atherosklerotischen Läsionen ist die Akkumulation von SMC, zusammen mit Makrophagen und Lymphozyten in der (Tunika)-Intima dieser Arterien. In fibrotischen Plaques sind SMC der vorherrschende Zelltyp und ihre Akkumulation und Proliferation ist ein kritischer Faktor für das Ausmaß und die Charakteristik der Läsion (Raines, 1993; Ross, 1995). SMC und Makrophagen bilden Zytokine und Wachstumsfaktoren, die die Progression der Atherosklerose in Form eines *circulus vitiosus* beschleunigen. Als endogener Schutzmechanismus wird die Induktion der COX-2 und die Bildung von Prostacyclin in atherosklerotischen Gefäßen angesehen (Schrör, 1997; Belton et al., 2000; Egan et al., 2004;). Die Plasmakonzentration von PGI₂, die indirekt durch die Messung von 6-keto-PGF_{1α} bestimmt wird, liegt beim gesunden Menschen unter Ruhebedingungen bei ca. 5 pg/ml, ist jedoch bei Gefäßwandveränderungen wie der Atherosklerose deutlich erhöht (FitzGerald GA, 1984; Belton et al., 2000;). In gesunden Arterien ist die Expression der COX-1-mRNA und die des Proteins auf dem Gefäßendothel und auf SMC lokalisierbar, während eine Expression der COX-2 nicht nachgewiesen werden kann. Untersuchungen, welches Isoenzym an der Synthese von PGI₂ bei der Atherosklerose maßgeblich beteiligt ist, ergaben, dass sowohl die COX-1 als auch die COX-2 zum Anstieg des PGI₂-Spiegels beitragen (Belton et al., 2000). Die gesteigerte Bildung von PGI₂ und PGE₂ in glatten Gefäßmuskelzellen und die nachfolgende Aktivierung von Prostaglandin-Rezeptoren (IP-R und EP₂-R) führt zur Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels und Aktivierung cAMP/PKA-vermittelter Signaltransduktionswege (Rimarachin et al., 1994; Belton, 2000) und hemmt beispielsweise die Proliferation von SMC. Auch die Thrombozytenaggregation wird auf diese Weise inhibiert. Eine mögliche, nicht Thrombozyten-abhängige Beeinflussung der Blutgerinnung durch Prostaglandine ist bislang noch nicht systematisch untersucht worden. Denkbar wäre jedoch eine Interaktion der plasmatischen Koagulation durch eine mögliche PGI₂-induzierte TM-Expression.

1.4. Ziel der Arbeit

Die Atherosklerose wird heute zu den chronisch-entzündlichen Erkrankungen gezählt und ist mit einer endothelialen Dysfunktion verbunden. Das gesunde Endothel bildet eine nicht-thrombogene und für Leukozyten und Thrombozyten nicht-adhäsive Schicht, die unter anderem durch die Produktion von PGI_2 und NO den Gefäßtonus reguliert sowie das Gleichgewicht zwischen prothrombotischen und antithrombotischen Mediatoren aufrecht erhält. Im Zuge der Atherosklerose kommt es zu einer pathologischen Veränderung des Gefäßendothels. Dadurch werden die antikoagulatorischen Eigenschaften des Endothels in Richtung prokoagulatorischer Eigenschaften verschoben. Als Folge werden Thrombozyten aktiviert und es kommt zur Freisetzung von Arachidonsäure, die zu Prostaglandinen und TXA_2 umgewandelt wird. Weiterhin kann es zur Aktivierung der plasmatischen Gerinnung kommen. 2000 wurde die VIGOR-Studie (Bombardier et al., 2000) veröffentlicht, die als Nebenbefund ein erhöhtes Herzinfarkttrisiko für den COX-Inhibitor Rofecoxib ergab. COX-2-Inhibitoren hemmen vor allem die vaskuläre COX-2-abhängige PGI_2 -Bildung, während die COX-1-abhängige TXA_2 -Bildung unbeeinflusst bleibt. Auf diese Weise hemmen sie einen wichtigen antithrombotischen Mechanismus, bei gleichzeitig fehlender Hemmung des prothrombotischen TXA_2 . Bisher wurde angenommen, dass die antithrombotischen Effekte des PGI_2 ausschließlich auf dessen inhibitorische Wirkung auf die Plättchenfunktion zurückzuführen sind. Inhalt dieser Arbeit ist die Untersuchung eines weiteren Mechanismus der antikoagulatorischen Wirkungen des PGI_2 . Die Arbeitshypothese ist, dass vasodilatierende Prostaglandine (PGI_2 , PGE_2) die plasmatische Koagulation durch eine Induktion der TM-Expression in arteriellen SMC inhibieren und COX-2-Inhibitoren denen entgegenwirken.

Folgende Fragestellungen waren daher Gegenstand dieser Arbeit:

- I. Wird TM in humanen arteriellen SMC durch exogene Prostaglandine beeinflusst?
- II. Welche Rezeptoren sind an dieser Regulation beteiligt und welche Signaltransduktionswege sind involviert?
- III. Wird TM von endogen COX-1/COX-2-abhängig gebildeten Prostaglandinen reguliert?
- IV. Hat die TM-Expression von SMC eine funktionelle Bedeutung (z.B. PC-Aktivierung)?
- V. Welche Bedeutung könnten diese Befunde für das erhöhte Thromboserisiko bei einer Atherosklerose haben?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Puffer und Lösungen

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in höchster verfügbarer Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

Tabelle 1: verwendete Puffer und Lösungen

ACD:	85 mM Trisodiumcitrat x 2 H ₂ O 65 mM Zitronensäure x H ₂ O 111 mM Glukose
Amido-Schwarz Entfärbelösung:	25 % (v/v) Isopropanol 10 % Essigsäure
Amido-Schwarz Färbelösung:	0,1 % (m/v) Amidoschwarz 25 % (v/v) Isopropanol 10 % (v/v) Essigsäure
Blaumarker (10 x):	30 % Glycerol 0,04 % Bromphenol-Blau
Blot-Puffer:	1 x Laufpuffer ohne SDS 20 % Methanol
Coomassie-Blau Färbelösung:	0,2 % Coomassie Brilliant-Blau 40 % Methanol 10 % Essigsäure
DEPC-Wasser:	0,1 % (v/v) Diethyl-pyrocbonat
Fluca:	Fluo-Puffer, 2,5 % Z-Gly-Gly-Arg-AMC in DMSO
Fluo-Puffer:	20 mM Hepes 60 mg/ml BSA pH 7,35
10 x Laufpuffer:	250 mM Tris 1,9 mM Glycin 0,1 % SDS

4 x Laemmli-Puffer:	250 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7.0 8 % SDS 40 % Glycerin 20 % 2-Mercaptoethanol 0,001 % Bromphenolblau 100 mM Dithiothreitol (DTT)
PBS:	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 8,3 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4
RIA-Puffer:	50 mM Tris/HCl 4 mM EDTA pH 7,5
4 x Sammelgelpuffer:	0,5 mM Tris/HCl 0,4 % SDS pH 8.8
10 x TAE:	40 mM Tris 20 mM Na-Acetat 2 mM EDTA pH 7,8
10 x TBE-Puffer:	1 mM Tris 83 mM Borsäure 10 mM EDTA pH 7,4
TBS (10 x):	100 mM Tris/HCl 1,5 mM NaCl pH 7,4
TBST:	1 x TBS 0,1 % Tween 20
TBSTM:	1 x TBS mit: 0,1 % Tween 20 3 % Magermilchpulver

TM-Puffer	Testmedium (HEPES-Tyrode): 134 mM NaCl 12 mM NaHCO ₃ 2,9 mM KCl 0,36 mM NaH ₂ PO ₄ 1 mM MgCl ₂ 5 mM HEPES 5 mM Glukose pH 7,4
4 x Trenngelbuffer:	1,5 mM Tris/HCl 1 mM EDTA pH 8,0
Waschpuffer für Thrombozyten:	113 mM NaCl 4 mM Na ₂ HPO ₄ 24 mM Na H ₂ PO ₄ 4 mM KH ₂ PO ₄ pH 6,5
Working-Puffer: (für die Bestimmung des endogenen Thrombinpotentials)	20 mM Hepes 140 mM NaCl 5 mg/ml BSA pH 7,35

2.2. Substanzen

Tabelle 2: Im Zellversuch verwendete Substanzen

Substanz	Wirkung	Hersteller
PMA	PKC-Aktivator	Alexis, Grünberg
Iloprost	IP-Rezeptor-Agonist	Schering, Berlin
Forskolin	Adenylatzyklase-Aktivator	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
dbcAMP	cAMP-Analogon	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Thrombin	Serin-Protease	Dr. J. Stürzebecher, Zentrum für Vaskuläre Biologie und Medizin, Erfurt
Interleukin-1 β (IL-1 β)	Zytokin	Calbiochem, San Diego, DA, USA
Tumor Nekrosefaktor- α (TNF- α)	Zytokin	Biomol GmbH Hamburg
PGE ₂	EP-Rezeptor-Agonist	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Butaprost	EP ₂ -Rezeptor-Agonist	Dr. P Gardiner, Bayer, Middlesex, UK
ONO-AE1-329	EP ₄ -Rezeptor-Agonist	ONO Pharmaceuticals, Osaka, Japan
MB 28767	EP ₃ -Rezeptor-Agonist	Rhône-Poulenc Rorer, Vitry sur Seine, Frankreich
Cicaprost	IP-Rezeptor-Agonist	Schering, Berlin
PDGF-BB	Wachstumsfaktor	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Diclofenac	Unselektiver COX-Inhibitor	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Etoricoxib	Selektiver COX-2-Inhibitor	Laboratorien, Berlin Aldersdorf GmbH
Protein C	Zymogen	Enzym research Laboratories, South Bend, IN, USA
Aktiviertes Protein C	Enzym	Enzym research Laboratories, South Bend, IN, USA

2.3. Antikörper

Tabelle 3: Im Western-Blot und der Immunhistochemie verwendete Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
Thrombomodulin, TM-D3 (sc-13164) monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA.	1:140 in TBSTM
COX-2, monoklonal	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA	1:1000 in TBSTM
Tissue factor, monoklonal	American Diagnostica, St Stamford, CT, USA	1 : 1000 in TBSTM
Thrombomodulin (Immunhistochemie), polyklonal	American Diagnostica, St Stamford, CT, USA	1 : 250
SM-actin (Immunhistochemie), monoklonal, HHF 35	DAKO, Hamburg	1 : 100
COX-2 (Immunhistochemie), polyklonal	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA	1 : 150
goat anti-mouse IgG, HRP-konjugiert (sc-2005)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA.	Sekundäntikörper 1 : 3000 in TBSTM
goat anti-rabbit IgG, HRP-konjugiert (sc-2004)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA.	Sekundäntikörper 1 : 3000 in TBSTM

2.4. Zellkultur

Alle Substanzen für die Zellkulturmedien wurden von Gibco BRL Life Technologies, (Karlsruhe) bezogen. Die Kulturgefäße wurden von den Firmen Becton-Dickinson (Heidelberg) und Greiner (Solingen) bezogen.

2.4.1. Kultur glatter Gefäßmuskelzellen

Humane koronararterielle glatte Muskelzellen (CASMC) wurden entweder von der Firma CellSystems/BioWhittaker (Biotechnologie Vertrieb GmgH, St. Katherinen) bezogen, oder nach der Explant-Technik isoliert (Fallier-Becker P Rupp J, 1990). CASMC wurden in SMC Growth Medium 2 (C-22062) (PromoCell GmgH, Heidelberg) kultiviert und in SMC Basal Medium ohne Supplement Mix für 48 h gehungert. Zur Wiederherstellung der eingefrorenen Zellen wurde streng nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen.

Ebenso wurden glatte Gefäßmuskelzellen des Menschen (SMC) aus der Arteria mammaria oder der Vena saphena isoliert. Die Kultivierung der selbst isolierten SMC erfolgte in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) mit 15 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin bei 37°C unter Begasung mit 5 % CO₂. Nach Erreichen der Subkonfluenz wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA (0,05 %/0.5 mM) nach einmaligem Waschen mit PBS subkonfluent passagiert. Vor den jeweiligen Versuchen wurden die Zellen, soweit nicht anders vermerkt, zweimal mit PBS gewaschen und für 48 h in serumfreiem DMEM mit 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin (DMEM/PS) inkubiert. Danach erfolgte Zugabe der verschiedenen Stimuli in den angegebenen Konzentrationen und für die angegebenen Zeiten. Für die jeweiligen Experimente wurden Zellen der Passagen 3-10 verwendet.

2.4.2. Kultur von Endothelzellen

Humane koronararterielle Endothelzellen (HCAEC) wurden ebenfalls von der Firma PromoCell (PromoCell GmgH, Heidelberg) bezogen und in den vom Hersteller empfohlenen Medien kultiviert. Nach Erreichen der Subkonfluenz wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA (0,05 %/0.5 mM) nach einmaligem Waschen mit PBS subkonfluent passagiert. Vor den jeweiligen Versuchen wurden die Zellen, soweit nicht anders vermerkt, zweimal mit PBS gewaschen und für 24 h in serumfreiem Medium inkubiert. Danach erfolgte Zugabe der verschiedenen Stimuli in den angegebenen Konzentrationen und für die angegebenen Zeiten. Für die jeweiligen Versuche wurden Zellen der Passagen 3-10 verwendet.

2.5. Präparation und Analyse von RNA

2.5.1. Isolierung der Gesamt-RNA aus humanen Zellen

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus kultivierten humanen Zellen erfolgte mittels Trizol- (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe) bzw. Tri-Reagent (Sigma-Aldrich, Deisenhofen). Generell wurde bei der Präparation von RNA Diethyl-Pyrocbonat (DEPC)-H₂O verwendet. Die Zellen wurden direkt nach Abnahme des Mediums in der Kulturschale durch Zugabe von Trizol-Reagenz/Tri-Reagent (1 ml/10 cm²) lysiert. Nach Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurden die RNA-Proben in sterile Eppendorf-Gefäße überführt, mit 200 µl Chloroform/ml Trizol versetzt, ausgeschüttelt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 min zentrifugiert (5000 rpm, 4°C, Beckman J2-HS Zentrifuge; JA 20-Rotor oder 13000 rpm, 4°C, Heraeus Biofuge 13). Die Fällung der RNA aus dem Überstand erfolgte mit 500 µl Isopropanol/ml Trizol bei Raumtemperatur für 10 min und anschließender Zentrifugation für 30 min (12000 rpm, 4°C, Beckman J2-HS Zentrifuge; JA 20-Rotor oder 13000 rpm, 4°C, Heraeus Biofuge 13). Das RNA-Pellet wurde in 200 µl DEPC-H₂O gelöst mit 5 M Kaliumacetat-Lösung (1/10 des Volumens) versetzt und anschließend erneut mit Ethanol ausgefällt. Nach erneuter Zentrifugation für 30 min bei 4 °C wurde das RNA-Pellet an der Luft getrocknet, anschließend in DEPC-H₂O gelöst und für 5 min bei 65 °C geschüttelt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei – 20 °C.

2.5.2. Quantifizierung der RNA

Reinheit und Konzentration der RNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm im Genequant II DNA/RNA Calculator (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) überprüft. Durch Bildung des Quotienten aus den beiden Absorptionswerten (260 nm/280 nm) kann die Reinheit der RNA abgeschätzt werden. Dieser Wert sollte zwischen 1,5 und 2 liegen. 1 OD₂₆₀ = 40 µg/ml RNA.

2.6. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Semiquantitative RT-PCR Reaktionen wurden in einem TRIO-Thermo-Cycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt.

2.6.1. Für die RT-PCR verwendete Primer

Tabelle 4: verwendeten RT-PCR-Primer

Gen	Primer-Sequenz	Grösse des PCR-Fragments	Annealing-Temperatur (°C)
GAPDH	5': TGATGACATCAAGAAGGTGG TGAA 3': TCCTTGGAGGCCATGTAGGC CAT	238	52, 55, 60, 62
hTM	5': CATTCGGGCTTGCTCATAGGC 3': GCAATAACCAGCCGTCGGAAG	502	60
hEP₂-Rezeptor	5': GCTGGACTATGGGCAGTACG 3': GGTAGGAATCCGGAGGACAA	450	60
hEP₃-Rezeptor	5': TCGGGCTCTCCTCGTTGTTC 3': CGACAAGCGGACCGAAGTGA	591	60
hEP₄-Rezeptor	5': ACTACGTGGACAAGCGATTG 3': GTAGGCTTAACGAAGACACT	575	60
hIP-Rezeptor	5': GCGTCCTCTTCTGCGCGCTGCC CCTGCTGG 3': GGACTGTCGTCGTCACTCTACC CCCTGG	370	60

2.6.2. RT-PCR mit Qiagen® One-Step RT-PCR Kit

Alle RT-PCRs wurden mit dem Qiagen® One-Step RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Als interner Standard wurde in allen Experimenten, wenn nicht anders vermerkt, die Expression des Enzyms GAPDH verwendet.

RT-PCR Ansatz: Es wurden 250 ng Gesamt-RNA eingesetzt.

5 µl 5 x RT-PCR-Puffer
5 µl Q-Solution
1 µl dNTPs
1 µl Enzym-Mix
GAPDH-Primer je (15-20 µmol/l)
genspezifische Primer je (15-20 µmol/l)
Gesamt-Volumen: 25 µl

RT-PCR Bedingungen:

30 min, 50 °C
15 min, 95 °C
1 min, 95 °C }
1 min, 60 °C } 30 Zyklen
1 min, 72 °C }
15 min, 72 °C

2.6.3. Densitometrische Auswertung der RT-PCRs

Zunächst wurden die RT-PCR Proben in 1 – 1.5 %igen Agarose-Gelen unter Zusatz von Ethidiumbromid (0.5 µg/ml) elektrophoretisch aufgetrennt. Densitometrisch ausgewertet wurden die Intensitäten der unter Bestrahlung mit uv-Licht sichtbar gemachten DNA-Banden. Dies erfolgte mit einer Geldoc 2000 Apparatur und mit Hilfe des Programms Quantity One Version 4.1.0 / Geldoc (Biorad, München). Für jede Probe wurde der Quotient aus den Intensitäten des zu untersuchenden Gens und der GAPDH als internen Standard gebildet. Wenn nicht anders angegeben, wurde der Quotient von nicht-stimulierten Zellen (0 h = Kontrollen) als 1 definiert und die Quotienten von stimulierten Zellen zu diesem Kontrollwert

in Relation gesetzt. Angegeben werden diese Werte als relative mRNA-Expression, bezogen auf die Kontrolle.

2.7. Präparation und Analyse von Proteinen im Western-Blot

2.7.1. Präparation von Proteinen aus humanen Zellen

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und für die Untersuchung im Western-Blot durch Zugabe von 1 x Laemmli-Puffer lysiert. Anschließend wurden diese mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturplatten gelöst, 5 min bei 95°C denaturiert, 2 sec im Eppendorf-Gefäß sonifiziert und bei 14000 rpm für 10 min zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, Centrifuge 5415 C, Hamburg).

2.7.2. Auftrennung der Proteine im Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine aus dem Zell-Lysat erfolgte nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Dazu wurde zunächst ein Trenngel (8 - 12 % Acrylamid) gegossen, das dann mit einem Sammelgel (5 % Acrylamid) überschichtet wurde. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 150-200 V in einer BioRad Elektrophoresekammer (BioRad, München) mit 1 x Laufpuffer + 0.1 % SDS. Ein Peroxidase-konjugierter hochmolekularer Proteinstandard (New England Biolabs) und eine *Prestained Protein Ladder*, ~10-180 kDa (Fermentas, St.Leon-Roth) dienten als Molekulargewichts-Marker.

2.7.3. Transfer von Proteinen

Die Proteine wurden mittels einer „Semi-Dry“ Blotting-Apparatur (BioRad, München) auf eine Polyvinyliden Difluoride Membran (PVDF, Millipore, ImmobilonP, Sigma, Deisenhofen) transferiert. Die PVDF-Membran wurde mit Methanol aktiviert und der Transfer erfolgte mit Blotpuffer bei 15 V für ca. 60 min.

2.7.4. Hybridisierung und Detektion von Proteinen

Zur Sättigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur in TBSTM prähybridisiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit dem Primärantikörper, TM, COX-2 und Tissue Faktor in TBSTM für 1-2 h bei Raumtemperatur (RT) oder über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde 3 x für 10 min mit TBST bei RT gewaschen, dann erfolgte die Hybridisierung mit Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern (1:3000) in TBSTM für 1 h bei RT. Nach 3 x 10 min Waschen mit TBST wurden die Proteine mittels Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) nach Angaben des Herstellers detektiert. Bei dieser Methode wird die Peroxidaseaktivität auf der Membran durch die durch Oxidation von Luminol mit H₂O₂ entstehenden Lichtemission nachgewiesen. Die Chemilumineszenz wurde durch Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm (HyperfilmTM ECLTM, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) sichtbar gemacht.

2.7.5. Prüfung auf gleichmäßige Proteinbeladung

Nach der Detektion der Protein-Expression wurde die PVDF-Membran mit TBST gewaschen und 10-30 min in einer Amidoschwarz-Färbelösung gefärbt. Anschließend wurde der überschüssige Farbstoff mit Amidoschwarz-Entfärbelösung ausgewaschen. Die Proteinbanden wurden auf Gleichmäßigkeit der Proteinbeladung auf der Membran kontrolliert.

2.7.6. Prüfung auf Vollständigkeit des Proteintransfers

Nach abgeschlossenem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde das Acrylamidgel mit Coomassie-Färbelösung für 10-20 min angefärbt und anschließend mit Wasser entfärbt. Das Gel wurde auf Vollständigkeit des Proteintransfers kontrolliert.

2.8. Durchflusszytometrische Analyse von SMC und Endothelzellen

Zur Analyse der Oberflächenexpression von TM wurden SMC oder Endothelzellen in 6-Loch-Platten unter Standardbedingungen bis zur Konfluenz kultiviert. Zur durchflusszytometrischen Untersuchung mussten diese zunächst abgelöst werden. Dazu wurde die 6-Loch-Platte zweimal mit PBS gewaschen und nachfolgend mit 500 µl auf 37 °C vorgewärmtes Dissoziationsmedium für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden dann durch mehrfaches Pipettieren vereinzelt. Anschließend wurden diese für 30 s bei 6000 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand verworfen und in 50 µl PBS resuspendiert. Zu dieser Zellsuspension wurden 20 µl PE-gekoppelter Antikörper gegen TM (CD 141, # 559781, BD Bioscience, Erembodegem, Belgien) gegeben. Parallel dazu wurden 10 µl Isotyp-PE-Antikörper zur Identifizierung unspezifischer Bindungen mit 50 µl Zellsuspension in der Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 250 µl Isoton® (Beckmann Coulter, Krefeld) verdünnt und sofort in einem EPICS-XL Zytometer (Beckmann Coulter, Krefeld) vermessen.

2.9. Bestimmung des endogenen Thrombinpotentials (ETP)

Die Endstrecke sowohl der intrinsischen als auch der extrinsischen Koagulationskaskade ist die Aktivierung von Thrombin. Thrombin fördert die Thrombozytenaggregation und katalysiert die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrinmonomere, die dann zu Fibrin polymerisieren können. In einem Gefäßabschnitt, in dem ein Gerinnungsprozess abläuft, bestimmt die Anzahl der natürlichen Substratmoleküle, die vom Thrombin gespalten werden können, das Ausmaß der thrombotischen Antwort. Natürliche Substrate werden außerordentlich schnell durch Thrombin gespalten. In diesem Assay wird ein künstliches Substrat verwendet, welches sehr langsam durch Thrombin umgesetzt wird. Die durch Thrombin umgesetzte Substratmenge ist somit proportional zum gebildeten Thrombin, zu der Zeit in der es aktiv ist und somit zur Fläche der Thrombin-Zeit-Kurve. Diese Fläche zeigt die Menge des natürlichen Substrats an, das potentiell umgewandelt werden kann. Es bestimmt das Ausmaß des möglichen plasmatischen Gerinnungsablaufes. Dieses Potential wird endogenes Thrombin-Potential (ETP) bezeichnet (Hemker et. al 1993).

Zur Analyse des ETP wurden SMC und EC in 96-Loch-Platten bis zur Konfluenz kultiviert, für 48 h durch Serumentzug gehungert und dann wie angegeben stimuliert. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen. Pro Loch wurden 10 µl Plasma, 10 µl Thrombozytenmembranen, 60 µl Working-Puffer und 20 µL Fluo-Puffer, der 2.5 % des fluorogenen Substrates Z-Gly-Gly-Arg-AMC (Bachem, Katalog # I-1140, Schweiz) in DMSO gelöst, zugesetzt. Die Thrombinbildung wurde in einem Mikrotiterplatten-Fluorometer des Typs Fluoroscan Ascent, Typ 374 (Labsystems, Helsinki, Finnland) mit einem Excitationsfilter bei 390 nM und einem Emissionsfilter bei 460 nM vermessen. Die Fluoreszenz wurde bei 37 °C in Intervallen von 3 s über einen Zeitraum von 80 min gemessen. Alle Experimente wurden, wenn nicht anders vermerkt, als Dreifachbestimmung ausgeführt. Die Datenauswertung erfolgte mittels Microsoft Excel (Microsoft).

2.10. Herstellung von gewaschenen Thrombozyten

Als Quelle für die verwendeten Thrombozyten diente frisch hergestelltes Buffy-coat-Blut von Blutspendern. Das Buffy-coat-Blut wurde aus dem Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, bezogen. Das Blut wurde im Verhältnis 1:7 mit ACD versetzt und für 10 min bei RT und 300 x g zentrifugiert. Das so gewonnene Plättchen-reiche Plasma (PRP) wurde abgenommen und wiederholt mit ACD im Verhältnis 1:4 versetzt. Dazu wurde PGE₁ in einer Endkonzentration von 50 nM gegeben und für weitere 10 min bei RT und 650 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das gebildete Thrombozytenpellet in WP und 50 nM PGE₁ resuspendiert. Das verwendete Volumen entsprach der doppelten Menge an PRP. Die Thrombozytensuspension wurde erneut bei 650 x g für 10 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Thrombozyten in TM resuspendiert. Die Thrombozytensuspension wurde auf ca. 500.000 Thrombozyten/µl eingestellt, aliquotiert und bei – 80 °C eingefroren. Durch das Einfrieren bei –80 °C wurden die Thrombozytenmembranen zerstört, was zu einer Vergrößerung der negativ geladenen Oberfläche führt. Vor Versuchsbeginn wurden diese bei 37 °C aufgetaut und sofort verwendet.

2.11. Herstellung von Plättchen-armem Plasma (PPP)

Frisches Zitrat-Vollblut (Zitronensäure-Zitrat-Dextrose = *acid citrate dextrose*; ACD, 1:7 (V/V)) wurde aus der Ellenbeugevene gesunder Spender entnommen. Plättchen-armes Plasma wurde auf folgende Weise hergestellt: Das Blut wurde für 10 min bei 5000 x g bei RT zentrifugiert, wurde dann steril filtriert und anschließend für 1.5 h bei 100,000 g bei 4 °C erneut zentrifugiert. Das so gewonnene Plättchen-arme Plasma wurde aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Vor Versuchsbeginn wurde dieses bei 37 °C aufgetaut und sofort verwendet.

2.12. Bestimmung von 6-keto-PGF_{1α}

Das von SMC freigesetzte PGI₂ wurde in Form des stabilen Hydrolyseproduktes 6-keto-PGF_{1α} gemessen. Die Zellen wurden mit verschiedenen Substanzen in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Nach Ende der Versuchszeit wurden der Überstand abgenommen und der Gehalt von 6-Keto-PGF_{1α} mittels Radio-Immuno-Assay (RIA) (Schrör and Seidel, 1988) bestimmt.

2.13. Bestimmung von löslichem Thrombomodulin im Zellüberstand

Lösliches Thrombomodulin (sTM) wurde mit Hilfe des Immunobind® Thrombomodulin ELISA Kit (American Diagnostica, Greenwich, CT, USA) im Zellüberstand humaner CASMC und EC bestimmt. Dazu wurden Zellen in 96-Loch-Platten bis zur Konfluenz kultiviert, dann für 48 h gehungert und wie angegeben stimuliert. Der Zellüberstand wurde abgenommen und unverdünnt auf die mit Antikörper beschichtete Platte des Kits transferiert. Die Analyse der sTM-Konzentration erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

2.14. Bestimmung der Thrombomodulin-Oberflächenaktivität

CASMC wie auch HCAEC wurden auf 96 Loch-Platten verteilt und mit verschiedenen Substanzen für die angegebenen Zeiten stimuliert, nachdem sie für 48 h gehungert wurden. Die Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen und dann mit serumfreiem Medium unter Zusatz von 20 mM HEPES, 200 µg/ml BSA, 400 nM Protein C (PC) und 10 nM Thrombin inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 80 min bei 37 °C wurde der Überstand abgenommen und zu

einer Lösung von 20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 nM NaCl, 1 mg/ml BSA und 10 U/ml Hirudin im Verhältnis 1:1 gegeben. Diese Proben wurden 5 min inkubiert, um die Thrombin-Aktivität mittels Hirudin zu inhibieren. Die Menge des gebildeten aktivierten Protein C (aPC) wurde nach Zusatz des chromogenen Farbstoffes S-2366 (Chromogenix, Mailand, Italien) in einer Endkonzentration von 0.75 mM bei 405 nm in einem BioRad micro plate reader (Modell 550) (BioRad, München) vermessen. Bei allen Versuchen wurde auch eine zellfreie Probe mit der Protein C/Thrombin Lösung inkubiert, um den Basalwert der Thrombin-katalysierten Protein C Aktivierung zu erfassen.

2.15. Morphologische Analyse humaner atherosklerotischer Läsionen

Proben aus der Arteria Carotis interna, die bei einer Atherektomie gewonnen wurden, (9 Frauen, 10 Männer; Altersdurchschnitt 68 Jahre (Bereich: 52 - 83)) wurden retrospektiv aus dem Archiv der Instituts für Pathologie, Universität Düsseldorf, zusammengestellt. In allen Fällen war ein Verschluss einer der Carotiden festgestellt worden. Die Proben wurden mit 4 % gepuffertem Formaldehyd fixiert. Es wurden transversale Schnitte angefertigt und diese in Paraffin eingebettet. Der Nachweis von TM erfolgte mit einem polyklonalen Antikörper (goat anti-human trombospondin IgG, polyklonal, American Diagnostica Inc., Greenwich, England). Zusätzlich wurden SMC mittels SM-actin (monoklonal, HHF 35, 1:100, DAKOCytomation, Kopenhagen, Dänemark) und COX-2 (polyklonal, 1:150, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Mi, USA) in konsekutiven Schnitten angefärbt. Der TM-Erstantikörper wurde mit einem streptavidin/horseradish peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper unter Verwendung von Diaminobenzidin (DAKO, Kopenhagen, Dänemark) als chromogener Farbstoff nachgewiesen. Die Erstantikörper gegen SM-actin und COX-2 wurden durch einen alkalisch-phosphatase (AP)-konjugierten Zweitantikörper unter Verwendung von Fast Red (DAKO, Kopenhagen, Dänemark) als chromogenem Farbstoff nachgewiesen. Die Gegenfärbung wurde mit Haemalaun vorgenommen. Diese Analysen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. M. Sarbia, Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München, München durchgeführt.

2.16. Metabolische Markierung von Chondroitinsulfat-Seitenketten

Zum Verdau der Chondroitin-/Dermatansulfat-Seitenketten der gesamten zellassoziierten Proteoglykane (PGs) wurden zunächst HCAEC in 24-Lochplatten, für 24 Stunden mit 10 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{35}S]- H_2SO_4 ([^{35}S] Schwefelsäure, Hartmann Analytik, Braunschweig) inkubiert. Dadurch wurden die Sulfatgruppen der Glykosaminoglykan-Seitenketten radioaktiv markiert. Danach wurde das Medium verworfen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in serumfreiem Medium unter Zusatz von 1 mg/ml BSA mit Chondroitinase ABC (Chondroitin ABC Lyase, ICN Biomedicals, Inc., Ohio, USA) in verschiedenen Konzentrationen verdaut (3 h, 37 °C). Chondroitinase ABC ist eine Exoglykosidase, die spezifisch Chondroitinsulfat und Dermatansulfat in Disaccharide spaltet. Nach dem Verdau wurde die überstehende Lösung verworfen und der Zellrasen in Harnstoffpuffer (8 mol/l Harnstoff, 0,025 M NaCl, 0, 5% Triton X 100, 200 μl , 15 min RT) aufgelöst. Nachfolgend wurde das Lysat eingefroren und der Gehalt an radioaktiv markierten Glykosaminoglykanen mittels Cetylpyridiniumchlorid-Präzipitation (Wasteson et al., 1973) bestimmt.

2.17. Bestimmung der DNA-Syntheserate

Als Maß für die Proliferation von SMC wurde die DNA-Syntheserate anhand des Einbaus von Tritium-markiertem Thymidin ([^3H]-Thymidin) in die zelluläre DNA bestimmt. Hierfür wurden SMC in 24-Loch-Platten kultiviert, 48 h durch Serumentzug in der Ruhephase (G0) des Zellzyklus arretiert ("synchronisiert") und anschließend für weitere 24 h mit den entsprechenden Substanzen stimuliert. [^3H]-Thymidin (DuPont NEN, Dreieich) wurde 4 h vor Ablauf der Inkubationszeit zugesetzt (1 $\mu\text{Ci/ml}$). Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte eine Inkubation mit eiskalter Perchlorsäure für 2 min und ein erneuter Waschschrift mit PBS. Abschließend wurden die Zellen durch Zugabe von NaOH (0.1 M, 300 $\mu\text{l/Loch}$) unter Schütteln im Wasserbad (37 °C, 30 min) von der Oberfläche der Kulturplatte gelöst. Die Überstände wurden in Szintillationsgefäße (Packard Bioscience, Groningen, Niederlande) überführt und mit jeweils 5 ml Szintillationslösung (Lumasafe Plus, Lumac LSC, Groningen, Niederlande) versetzt. Die inkorporierte Radioaktivität wurde mittels Flüssigkeitsszintillations-Spektrometrie in einem LS6000IC / LS6500 Szintillations-Zähler (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) als Zerfälle

pro Minute (*counts per minute*, cpm) quantifiziert. Die Messungen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.18. Statistik

Bei allen aufgeführten Ergebnissen wurden generell drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Bei Abweichungen ist dies im jeweiligen Ergebnisteil vermerkt. Bei RT-PCRs und Western-Blots wurde jeweils eine repräsentative Abbildung von drei separaten Versuchen mit ähnlichem Ergebnis dargestellt. Die Messdaten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) von n Einzelexperimenten angegeben. Das Signifikanzniveau p für α wurde mit 0.05 festgelegt. Signifikanzunterschiede wurden mittels des Bonferroni-Tests überprüft. Die statistische Berechnung erfolgte mit dem Computerprogramm GraphPad Prism-Software, Version 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

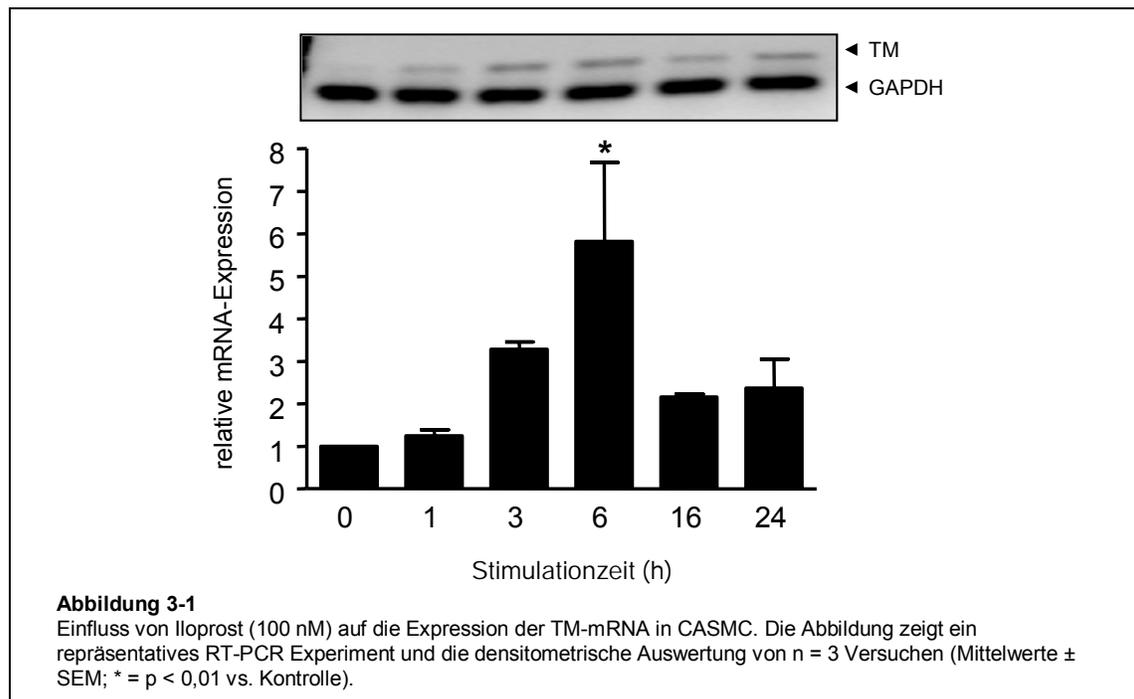
3. ERGEBNISSE

3.1. Einfluss exogener Prostaglandine auf die Thrombomodulin-Expression

3.1.1. Induktion der Thrombomodulin-mRNA-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen

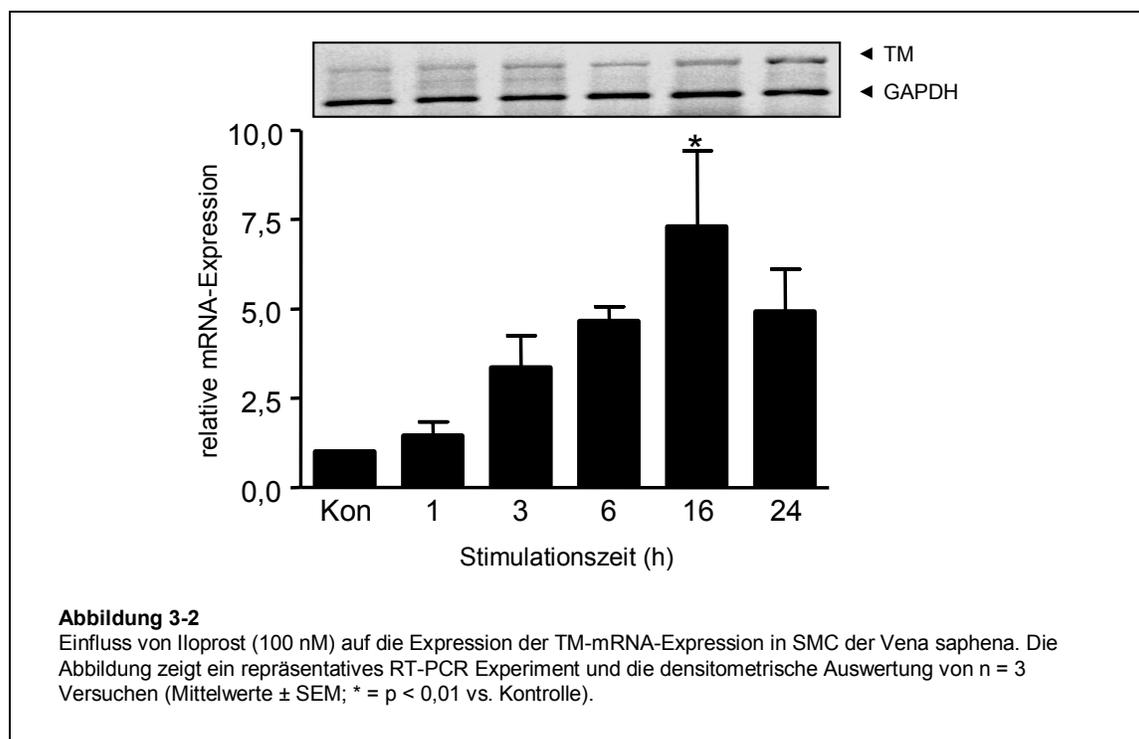
3.1.1.1. Induktion der Thrombomodulin-mRNA-Expression durch Iloprost

Eine vergleichende Genexpressions-Analyse aus dem eigenen Labor hatte gezeigt, dass TM um den Faktor $6,2 \pm 0,7$ durch Iloprost in humanen SMC induziert wird (Meyer-Kirchrath et al., 2004). Zur Verifizierung dieser Array-Daten wurde der Einfluss von Iloprost auf die Expression von TM in koronararteriellen glatten Gefäßmuskelzellen (CASMC) untersucht. Die Kinetik der Induktion wurde in gehungerten CASMC über einen Zeitraum von 24 h untersucht. Dazu wurden die Zellen mit Iloprost (100 nM) stimuliert. Anschließend wurde die RNA präpariert und die TM-mRNA-Expression mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt. Als interner Standard wurde die Expression des Enzyms GAPDH verwendet.



In Abbildung 3-1 ist zu erkennen, dass die Stimulation mit Iloprost zu einem signifikanten Anstieg der TM-mRNA in humanen CASMC führte. Iloprost bewirkte eine transiente Aufregulation der TM-Gen-Expression mit einem Maximum nach 6 h (relative m-RNA-Expression: $5,8 \pm 1,8$).

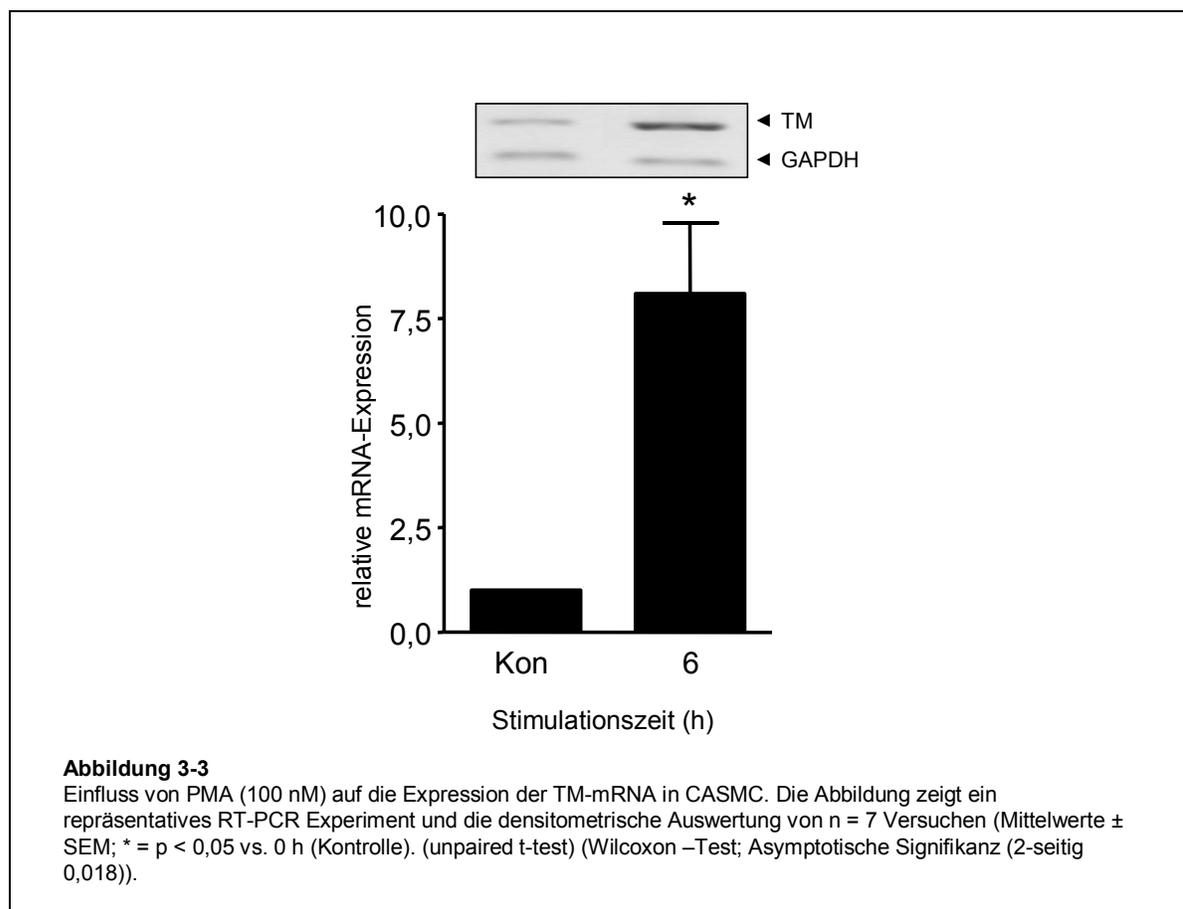
Die Untersuchungen dieser Arbeit sind hauptsächlich an arteriellen SMC vorgenommen worden. Zusätzliche Untersuchungen an venösen SMC erfolgten nur zur Bestätigung der allgemeinen Gültigkeit der TM-Regulation in SMC. So wurde die TM-Gen-Expression auch in SMC der Vena saphena nach Stimulation mit Iloprost (100 nM) untersucht. Nach Extraktion der RNA wurde auch hier die TM-mRNA-Expression mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert (Abb. 3-2).



In Vergleich zu CASMC konnte auch in venösen Zellen eine TM-Induktion in Abhängigkeit von der Stimulationszeit festgestellt werden. Diese zeigten jedoch ein Maximum erst nach 16-stündiger Iloprost-Inkubation und auch nach 24 Stunden noch erhöhte m-RNA-Spiegel.

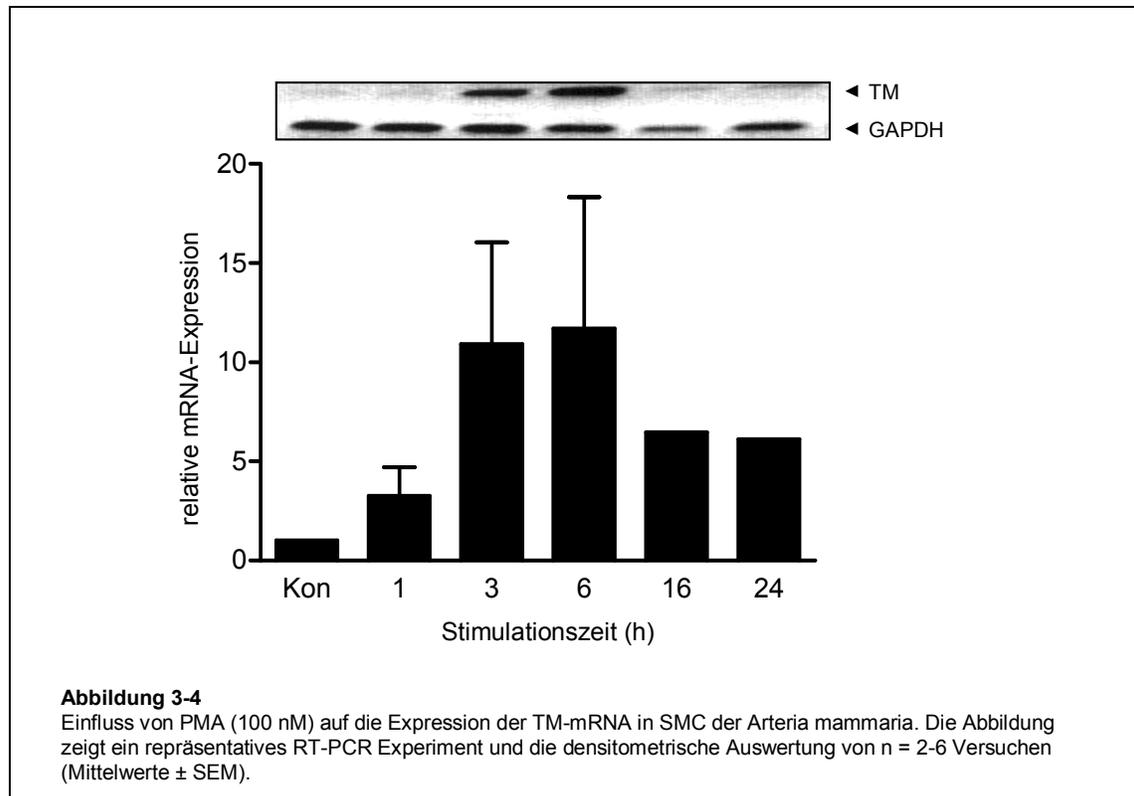
3.1.1.2. Regulation der Thrombomodulin-mRNA-Expression durch Phorbolster und Zytokine im Vergleich zu Iloprost

Proinflammatorische und mitogene Stimuli wie Endotoxin, Zytokine, Wachstumsfaktoren und Phorbolster führen zu einer Induktion des COX-2-Gens in zahlreichen Zell-Linien. Aus diesem Grund wurden CASMC mit dem Phorbolster PMA (100 nM), einem Aktivator der PKC, inkubiert. So konnte der Einfluss einer PKC-Aktivierung auf die TM-mRNA-Expression untersucht werden (Abb. 3-3).



Stimulation mit PMA führte in CASMC zu einer Erhöhung der TM-Gen-Expression. Diese war nach 6 h um den Faktor $8,1 \pm 1,7$ induziert (Abb. 3-3). Denkbar wäre, dass PMA, als bekannter Aktivator der PKC (Pang et al., 2002, Bradbury DA, 2002), die TM-Expression über eine Induktion der COX-2 und die daraus resultierende erhöhte Prostaglandin-Synthese induziert.

Die Kinetik des Zeitverlaufes der TM-Expression nach PMA-Exposition in SMC der Arteria mammaria war ebenfalls von Interesse. PMA bewirkte eine transiente Aufregulation der TM-Gen-Expression (Abb. 3-4). Verglichen mit der Induktion nach Iloprost war die PMA-induzierte Expression jedoch stärker ausgeprägt. Nach 3 h war eine Induktion der mRNA-Expression in SMC der Arteria mammaria um den Faktor $10,9 \pm 5,1$ und nach 6 h um den Faktor $11,7 \pm 6,6$ festzustellen.

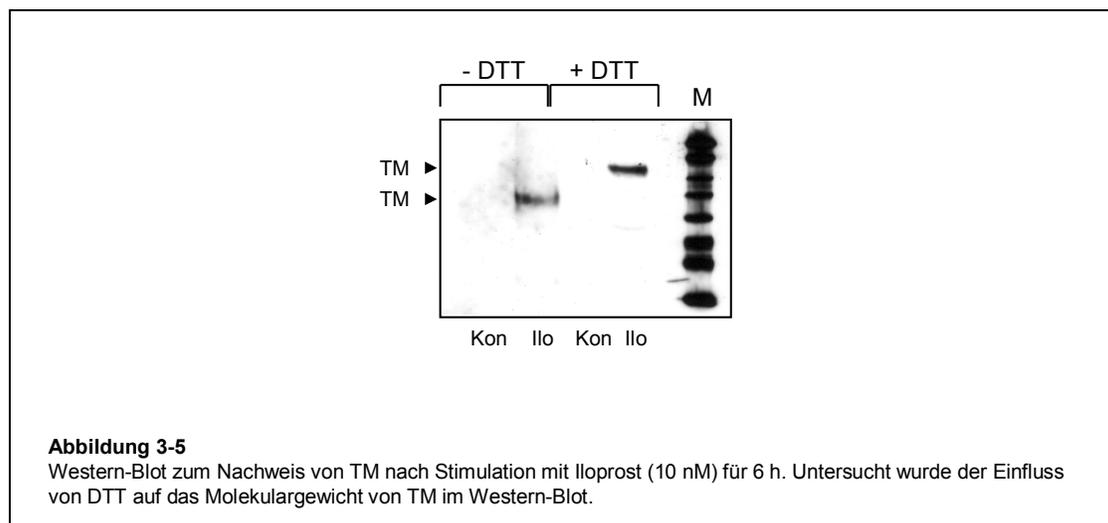


Zytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), wie auch das bakterielle Endotoxin Lipopolysaccharid, die in anderen Untersuchungen die COX-2 in humanen SMC induzierten (Bishop-Bailey et al., 1998), wurden ebenfalls zur Stimulation von CSMC eingesetzt, um über eine verstärkte COX-2-abhängige Prostaglandin-Synthese die TM-mRNA-Expression zu induzieren. Hier zeigte sich jedoch keine signifikante Induktion der TM-Gen-Expression (Daten nicht gezeigt). Auch war die Induktion der COX-2 und die damit verbundene Zunahme der PG-Synthese gering und möglicherweise nicht ausreichend für einen biologischen Effekt.

3.1.2. Thrombomodulin-Protein-Expression

3.1.2.1. Charakterisierung des Thrombomodulin-Proteins

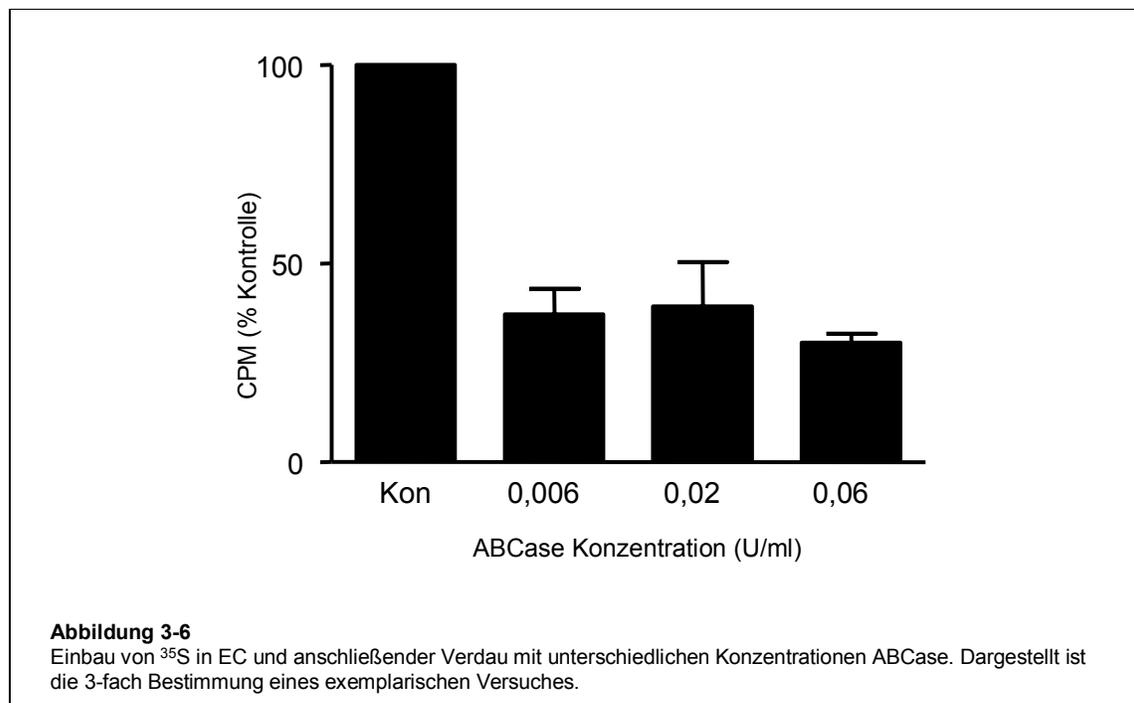
Unter nicht reduzierenden Bedingungen resultieren die intramolekularen Disulfidbrücken von TM in einer kondensierten Tertiärstruktur, die dazu führt, dass auf ein Natrium dodecyl sulfate-polyarylamid (SDS)-Gel aufgetragen humanes TM ein Molekulargewicht von ca. 75 kDa besitzt. Unter reduzierenden Bedingungen werden diese intramolekularen Disulfidbrücken gespalten, wodurch sich TM entfaltet und bei der Detektion mittels SDS-Gelelektrophorese ein scheinbar höheres Molekulargewicht erhält (ca. MW = 105 kDa) (Salem et al., 1984; Dittman and Majerus, 1990). Zur Bestätigung, dass der verwendete Antikörper spezifisch TM im Western-Blot detektiert, wurden zwei Löcher einer 12-Loch-Platte CASMC mit Iloprost (10 nM, 6 h) stimuliert, anschließend in Laemmli lysiert. Eine der beiden Proben wurde mit Dithiothreitol (DTT 100 mM) behandelt. Die Analyse des Western-Blots zeigte eine deutliche Verschiebung des TM-Proteins zu einer Bande eines höheren Molekulargewichtes nach Zusatz von DTT (Abb. 3-5). Anhand der Verschiebung des Molekulargewichtes von TM unter reduzierenden Bedingungen konnte somit gesichert werden, dass der verwendete Antikörper spezifisch TM im Western-Blot detektiert.



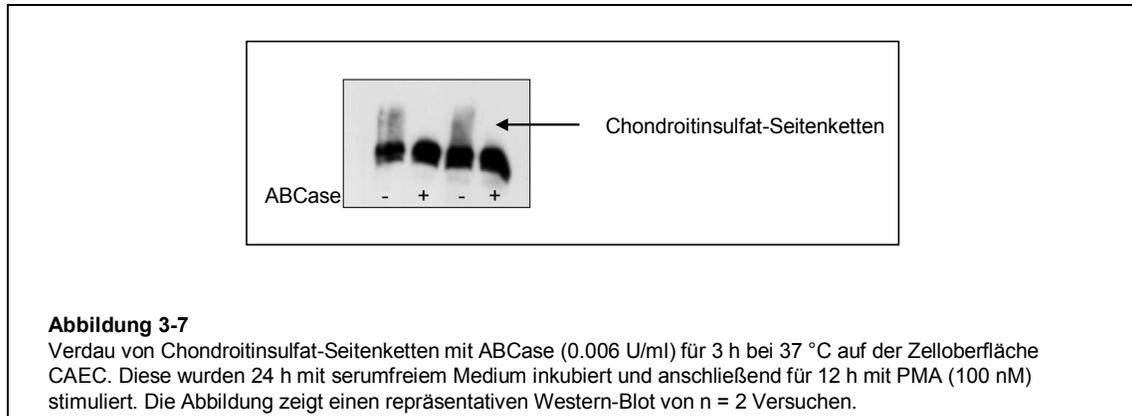
Der nächste Versuch diente dazu, eine Methode zu etablieren, bei der Chondroitinsulfat-Seitenketten auf der Zelloberfläche abgespalten werden. Diese Chondroitinsulfat-Seitenketten des TM spielen eine bedeutende Rolle bei der direkten Interaktion des Thrombins mit

prokoagulatorischen Substraten und Rezeptoren, sowie für die Kinetik der PC-Aktivierung des Thrombin/TM-Komplexes (Koyama et al., 1991b; Koyama et al., 1991a; Parkinson et al., 1992). Das Vorhandensein von Chondroitinsulfat-Seitenketten verstärkt auch die Aktivierung von Protein C (Parkinson et al., 1990).

Um zu überprüfen, ob der Verdau von Chondroitinsulfat-Seitenketten auf der Oberfläche kultivierter EC effektiv ist, wurden Zellen mit radioaktiv markierter Schwefelsäure [^{35}S] inkubiert, um die Glykosaminoglykane radioaktiv zu markieren. Anschließend wurde mit Chondroitin-ABC-Lyase (ABCCase) verdaut. Abbildung 3-6 zeigt den Abbau radioaktiv markierter Chondroitinsulfat-Seitenketten nach Verdau mit unterschiedlichen Konzentrationen ABCase. Es konnte gezeigt werden, dass schon eine Konzentration von 0,006 U/ml zu einer maximalen Reduktion der Chondroitinsulfat-Seitenketten auf ca. 30 % des Kontrollwertes führte. Die restlichen 30 % repräsentieren wahrscheinlich Heparansulfat-Seitenketten - Proteoglykane, die nicht von dem verwendeten Enzym gespalten werden.

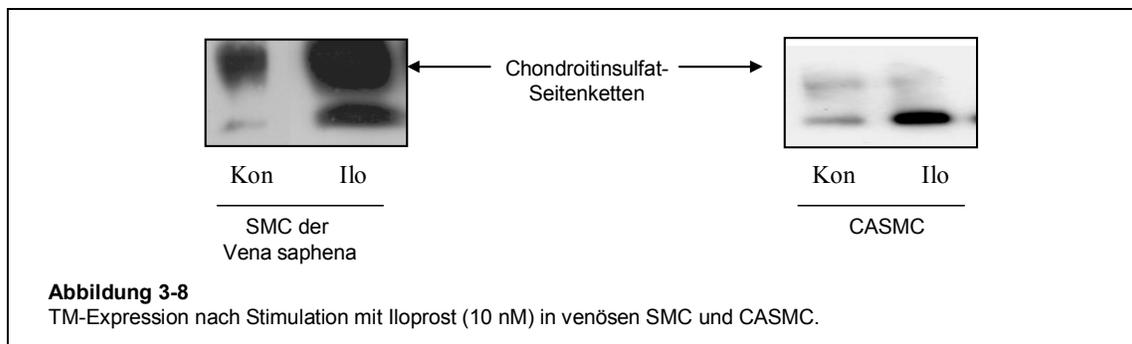


Anschließend wurde die TM-Protein-Expression hinsichtlich der Expression von Chondroitinsulfat-Seitenketten überprüft. Dazu wurden EC mit 0,006 U/ml ABCase für 3 h bei 37°C verdaut, der Überstand verworfen und die Zellen in Laemmli-Puffer lysiert.



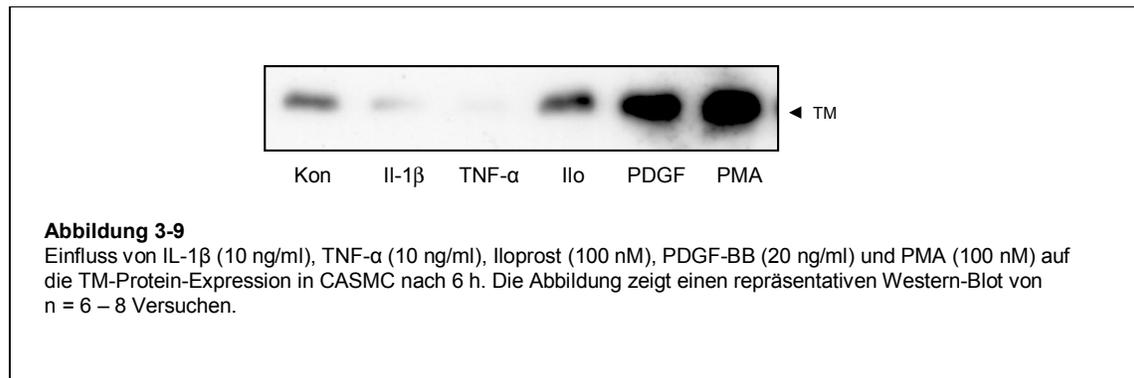
Die Western-Blot Analyse zeigte, dass der Anteil des höhermolekularen TM oberhalb der Hauptbande durch den Verdau mit Chondroitin-ABCCase entfernt wurde. Daher kann davon ausgegangen werden, dass ein kleiner Teil des TM mit Chondroitinsulfat glykosyliert ist (Abb. 3-7).

Bei genauer Betrachtung der TM-Bande von SMC der Vena saphena ist zu erkennen, dass auch diese eine breite, aber deutlich zu erkennende Bande oberhalb der Hauptbande aufweisen, die vermutlich mit Chondroitinsulfat glykosyliertes TM darstellt. Die TM-Expression in CASMC zeigt, wenn überhaupt, nur eine Glykosylierung von geringem Ausmaß (Abb. 3-8).



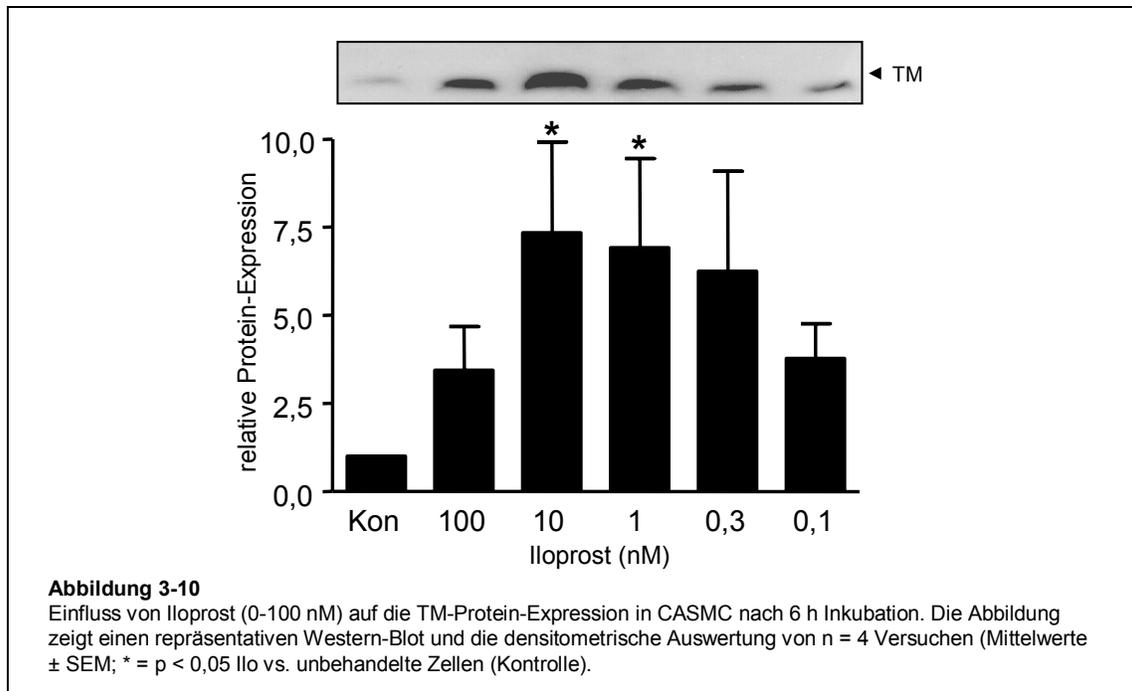
3.1.2.2. Induktion der Thrombomodulin-Protein-Expression durch verschiedene Substanzen

Nachdem in SMC verschiedener Herkunft TM auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden konnte, war der nächste Schritt, auch die Regulation auf Protein-Ebene mittels Western-Blot zu untersuchen. Dazu wurden CASMC zunächst mit IL-1 β (10 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml), Iloprost (100 nM), PDGF-BB (20 ng/ml) und PMA (100 nM) für 6 h stimuliert und anschließend die Protein-Expression im Western-Blot untersucht. Nach Inkubation mit dem spezifischen TM-Antikörper konnte eine Induktion der TM-Protein-Expression nach Stimulation mit Iloprost, PDGF-BB und PMA nachgewiesen werden. Die Stimulation mit IL-1 β und TNF- α reduzierte dagegen die TM-Expression (Abb. 3-9).

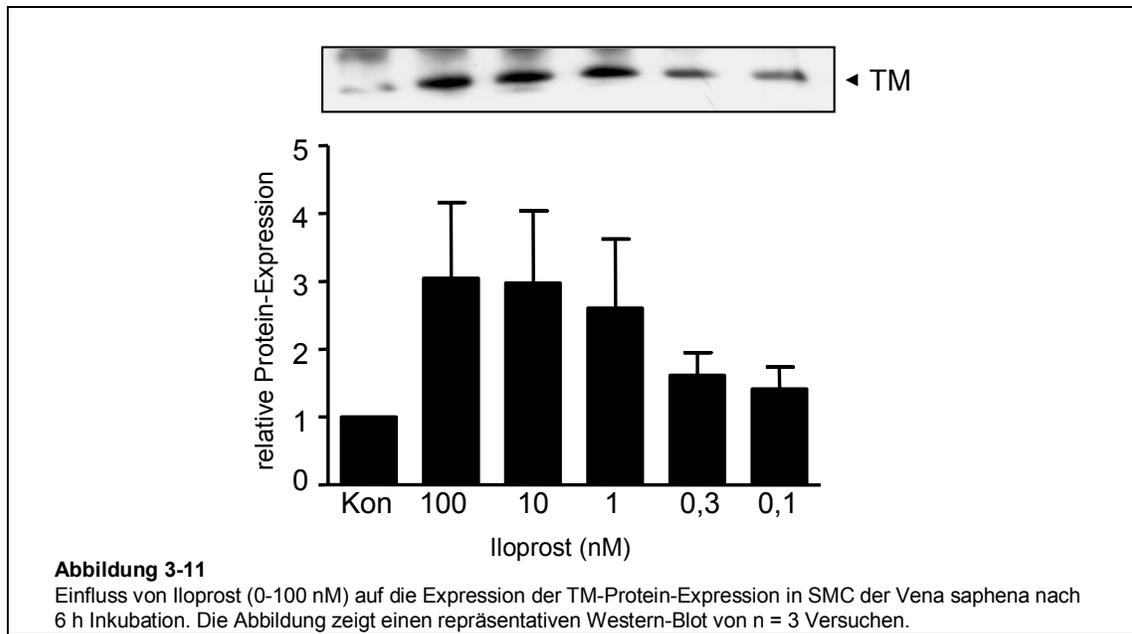


3.1.2.3. Konzentrationsabhängige Induktion der Thrombomodulin-Protein-Expression durch Iloprost und Cicaprost

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde in nachfolgenden Versuchen die TM-Protein-Expression in Abhängigkeit von der Iloprost-Konzentration untersucht. Dazu wurden CASMC wie auch SMC der Vena saphena für 6 h mit unterschiedlichen Iloprost-Konzentrationen (0,1 - 100 nM) inkubiert und anschließend im Western-Blot analysiert.



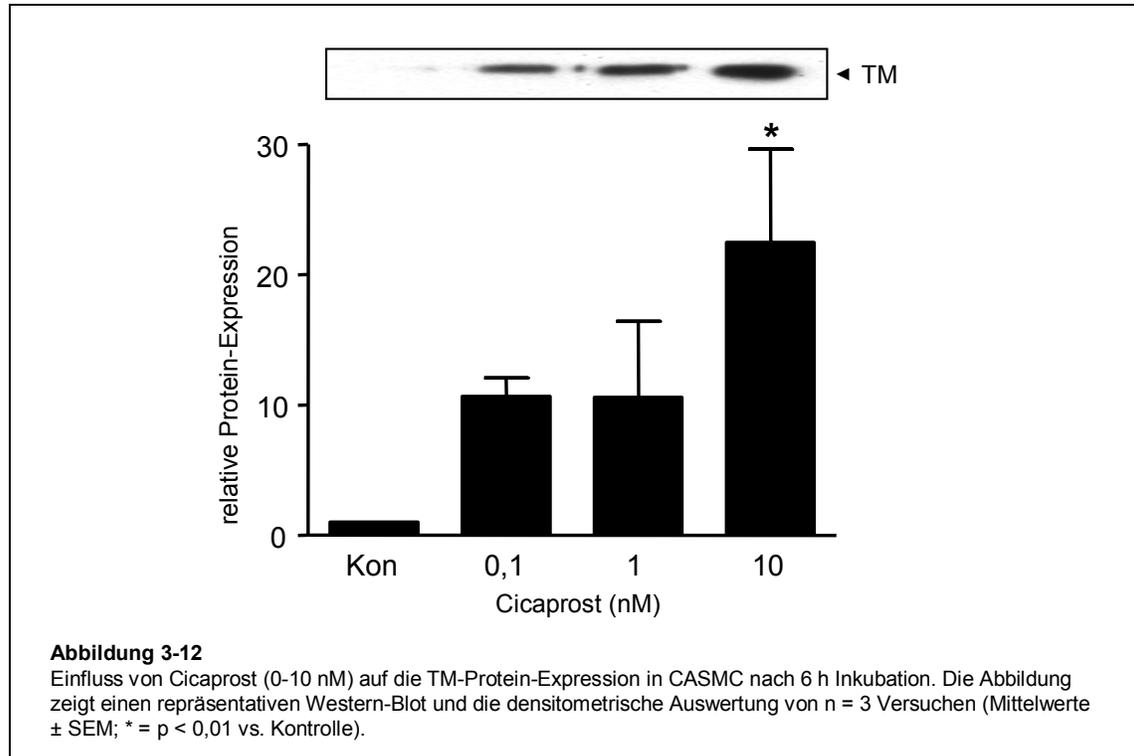
In CASMC (Abb. 3-10) zeigte sich eine Konzentrationsabhängigkeit der Iloprost-induzierten TM-Protein-Expression. Die höchste eingesetzte Konzentration Iloprost (100 nM) induzierte TM um den Faktor $3,9 \pm 1,2$. Interessanterweise bewirkten 10 nM Iloprost eine deutlich höhere Induktion ($7,3 \pm 2,5$). Besonders hervorzuheben ist, dass sich bereits bei sehr geringen Konzentrationen von Iloprost, die im Bereich endogener Prostaglandin-Konzentrationen liegen, ein deutlicher induzierender Effekt auf das TM-Protein nach 6-stündiger Stimulation zeigte (0,3 nM Iloprost $6,3 \pm 2,8$ und 0,1 nM $3,8 \pm 0,9$). Auch in SMC der Vena saphena (Abb. 3-11) konnte eine Konzentrationsabhängigkeit der TM-Induktion festgestellt werden. In Abbildung 3-11 ist auch ein exemplarischer Western-Blot einer Untersuchung an venösen SMC dargestellt.



Im Gegensatz zu CASMC führte in SMC der V saphena die höchste eingesetzte Konzentration auch zu der stärksten TM-Induktion (Abb. 3-11). Während nach Inkubation mit Iloprost-Konzentrationen von 10 und 1 nM noch eine starke Induktion nachzuweisen war, führten sehr geringe Iloprost-Konzentrationen (0,1 – 0,3 nM) zu einer schwächeren, wenn auch deutlichen TM-Protein-Expression. Dieser tendenzielle stimulierende Effekt sehr geringer Iloprost-Konzentrationen deutet darauf hin, dass endogen gebildete Prostaglandine auch *in vivo* eine Rolle bei der TM-Regulation in venösen SMC spielen könnten.

Iloprost ist ein Agonist des Gs-gekoppelten IP-Rezeptors. Besonders in hohen Konzentrationen fungiert Iloprost jedoch auch als Agonist des Gq-gekoppelten IP-Rezeptors. Schon der Nachweis, dass sehr geringe Konzentrationen von Iloprost zu einem Anstieg der TM-Expression führten, deutet auf die maßgebliche Beteiligung des Gs-gekoppelten IP-Rezeptors hin. Daher wurde in nachfolgenden Untersuchungen der Einfluss von Cicaprost, einem weiteren Prostacyclin-Mimetikum und spezifischem Agonisten des IP-Rezeptor, auf die TM-Expression untersucht. Humane CASMC wurden für 6 h mit unterschiedlichen Konzentrationen Cicaprost (0,1-10 nM) inkubiert und anschließend die TM-Protein-Expression im Western-Blot untersucht. Die Stimulation mit Cicaprost führte zu einer konzentrations-abhängigen Induktion von TM (Abb. 3-12). Dabei konnte nach Auswertung von n = 3 Versuchen ein signifikanter Anstieg um den Faktor $22,5 \pm 7,1$ der TM-Protein-Expression nach 6 h festgestellt werden. Auch geringe Cicaprost-Konzentrationen (0,1 – 1

nM) führten zu einer deutlichen TM-Induktion (0,1 nM Cicaprost = $10,7 \pm 1,4$; 1 nM Cicaprost = $10,6 \pm 5,9$). Dieser Effekt war allerdings aufgrund der großen Streuung der Einzelexperimente statistisch nicht signifikant.

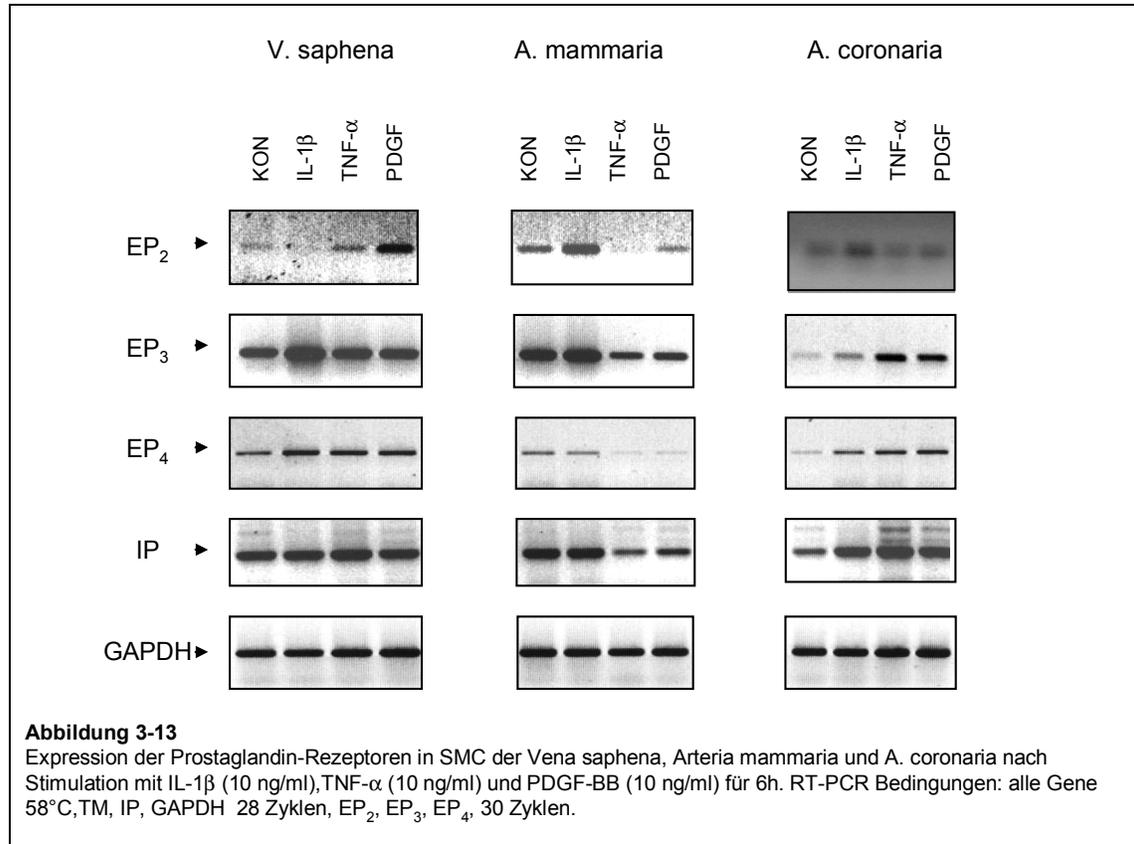


Diese Ergebnisse machen wahrscheinlich, dass das weniger selektive Iloprost, vor allem in höheren Konzentrationen (> 10 nM) auch an inhibitorische PG-Rezeptoren (EP_1) bindet, ein Effekt, der bei dem spezifischen IP-Liganden Cicaprost fehlt.

3.1.2.4. Thrombomodulin-Regulation durch Prostaglandin-Rezeptoren

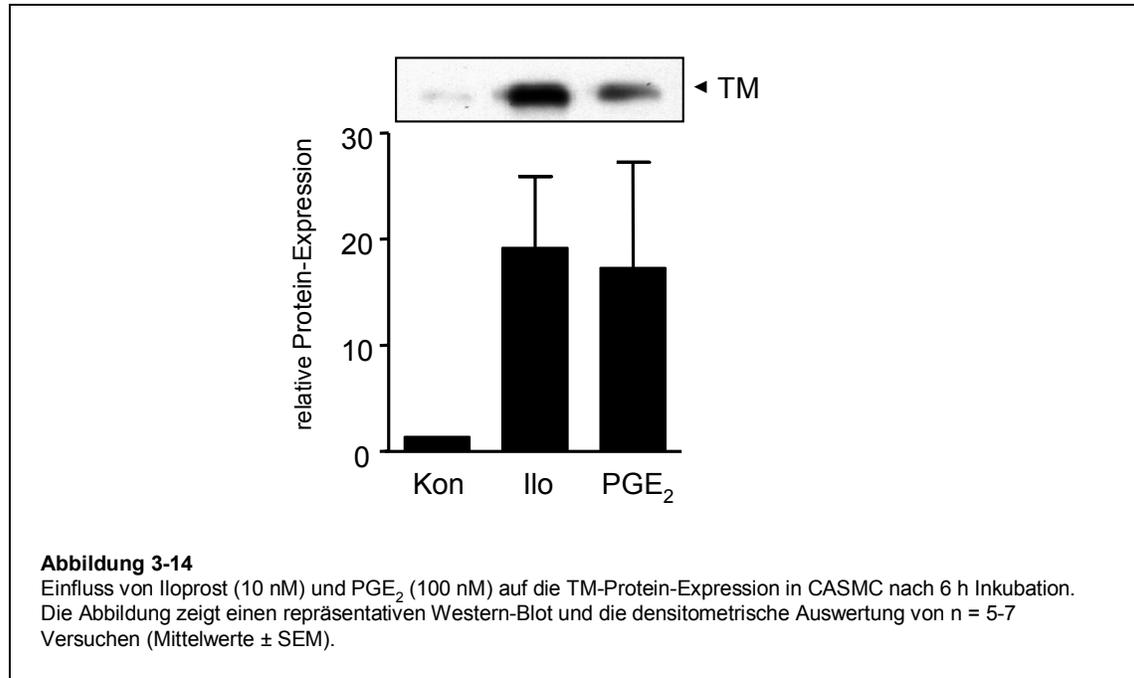
Neben Prostacyclin ist Prostaglandin E_2 (PGE_2) das Hauptprodukt der COX-katalysierten Prostaglandin-Synthese im vaskulären System. Als Agonist an EP-Rezeptoren führt PGE_2 , als Nettoeffekt, auch zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration in SMC (Narumiya et al., 1999). Die einzelnen EP-Rezeptoren sind jedoch an unterschiedliche G-Proteine gekoppelt, die wiederum verschiedene Signalwege aktivieren. Während die Stimulation des EP_2 - und EP_4 -Rezeptors zu einem Anstieg von cAMP führt, wird bei Agonisten-Bindung des EP_3 -Rezeptors über eine G_i -Aktivierung der cAMP-Spiegel reduziert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene Prostaglandin-Rezeptoren funktionell aktiv in SMC exprimiert werden und nach

Agonisten-Bindung zu einer Veränderung des cAMP-Spiegels führen (Debey et al., 2003). Zum Nachweis, dass die mRNA dieser Prostaglandin-Rezeptoren in den hier verwendeten Zelltypen exprimiert werden, wurden RT-PCR-Analysen durchgeführt.



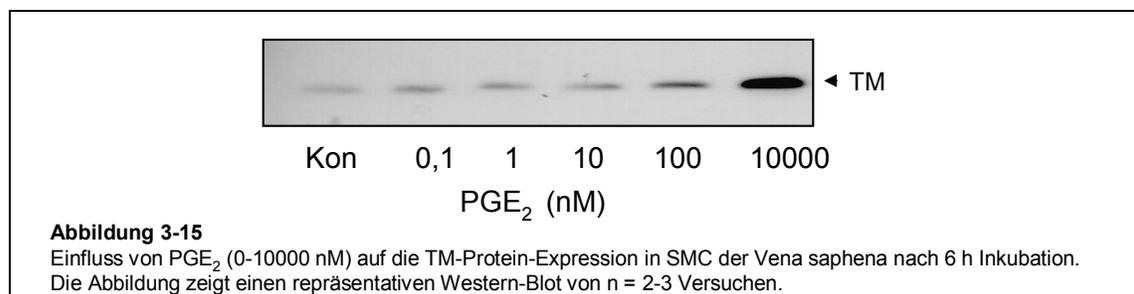
SMC der Vena saphena, Arteria mammaria und der Koronararterie wurden mit IL-1 β , TNF- α und PDGF für 6 h stimuliert. Anschließend wurde die Expression des IP- und der EP_{2,3,4}-Rezeptoren mittels RT-PCR exemplarisch analysiert. In allen drei Zelltypen konnten diese vier PG-Rezeptoren nachgewiesen werden. In der Abbildung 3-13 ist zu erkennen, dass die verschiedenen Rezeptoren durch die verwendeten Stimuli unterschiedlich reguliert wurden. Für diese Arbeit war nur das Vorhandensein der PG-Rezeptoren von Interesse. Daher wurde die Regulation dieser Rezeptoren nicht weiter untersucht.

Als nächstes wurde der Einfluss von PGE₂ auf die TM-Expression untersucht. Um zu überprüfen, ob eine Stimulation der EP-Rezeptoren zu einer TM-Induktion führt, wurden CASMC und SMC mit PGE₂ im Vergleich zu Iloprost für 6 h stimuliert (Abb. 3-14).



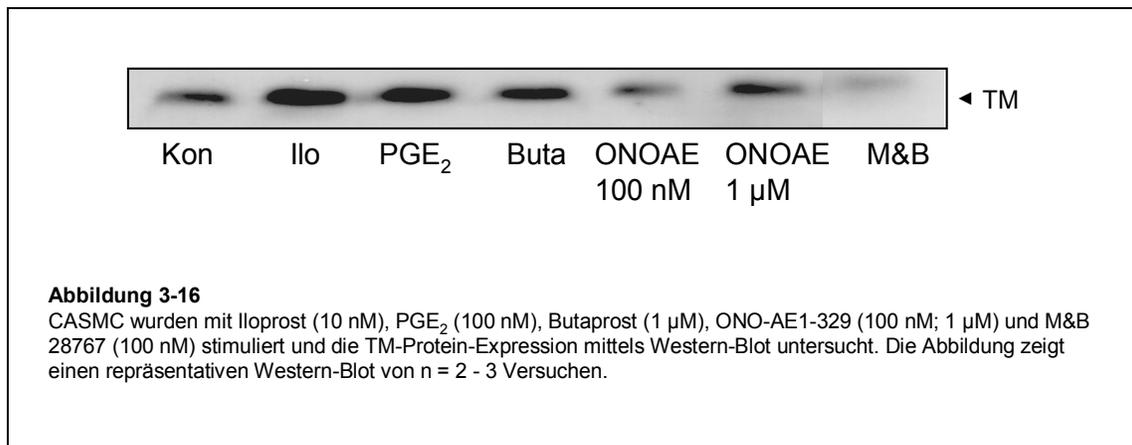
Die densitometrische Auswertung der Iloprost- versus PGE₂-induzierten TM-Expression zeigt eine Induktion um den Faktor $13,5 \pm 4,7$ bei einer Iloprost-Konzentration von 10 nM verglichen mit einer Induktion um den Faktor $12,2 \pm 6,9$ durch PGE₂ 100 nM. Dieser stimulierende Einfluss von PGE₂ auf die TM-Expression deutet auf eine Beteiligung der EP-Rezeptoren bei der Vermittlung der TM-Expression hin.

SMC der Vena saphena wurden mit unterschiedlichen PGE₂-Konzentrationen inkubiert. Wie Abbildung 3-15 zu entnehmen, ergab sich auch hier eine konzentrationsabhängige Zunahme der TM-Expression.

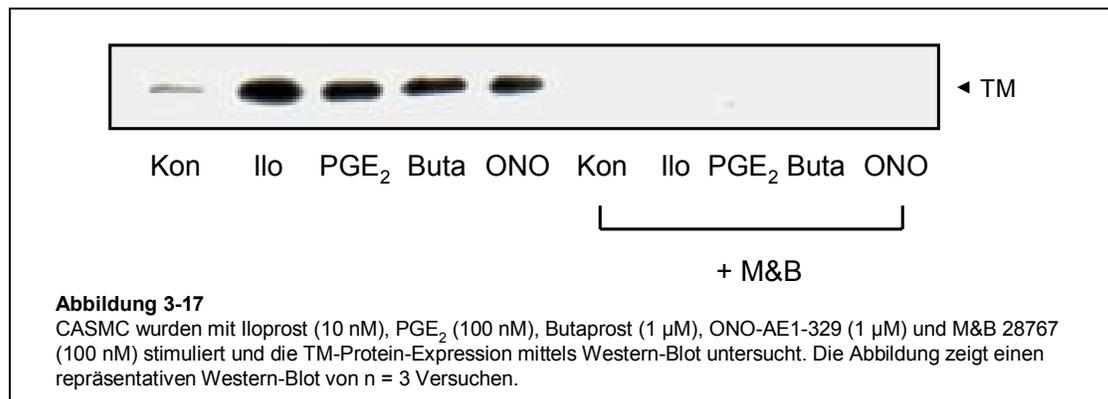


Verglichen mit der Iloprost-induzierten TM-Induktion war die Induktion der TM-Protein-Expression nach Stimulation mit PGE₂ deutlich schwächer ausgeprägt. Eine deutliche Induktion ergab erst die Stimulation ab 100 nM PGE₂.

Um die Funktion der einzelnen EP-Rezeptoren bei der Vermittlung der TM-Induktion genauer zu charakterisieren, wurden SMC mit Butaprost (Buta), einem spezifischen EP₂-Rezeptor-Agonisten, ONO-AE 1329, einem spezifischen EP₄-Rezeptor-Agonisten und MB 28767 (MB), einem spezifischen EP₃-Rezeptor-Agonisten, behandelt. Während die PG-Rezeptoren EP₂ und EP₄ an ein stimulierendes G-Protein gekoppelt sind, was nach Aktivierung zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels führt, ist der EP₃-Rezeptor an ein inhibitorisches G-Protein gekoppelt und reduziert, nach Agonisten-Bindung, über die Inhibition der AC den cAMP-Spiegel (Narumiya et al., 1999). Wie in Abbildung 3-16 dargestellt, führte die Stimulation des EP₂-Rezeptors mit Butaprost zu einer erhöhten Expression von TM. Auch die Stimulation des EP₄-Rezeptors, mit ONO-AE 1329, induzierte die TM-Protein-Expression. Im Gegensatz dazu reduzierte der EP₃-Rezeptors-Agonist M&B 28767 die TM-Expression.



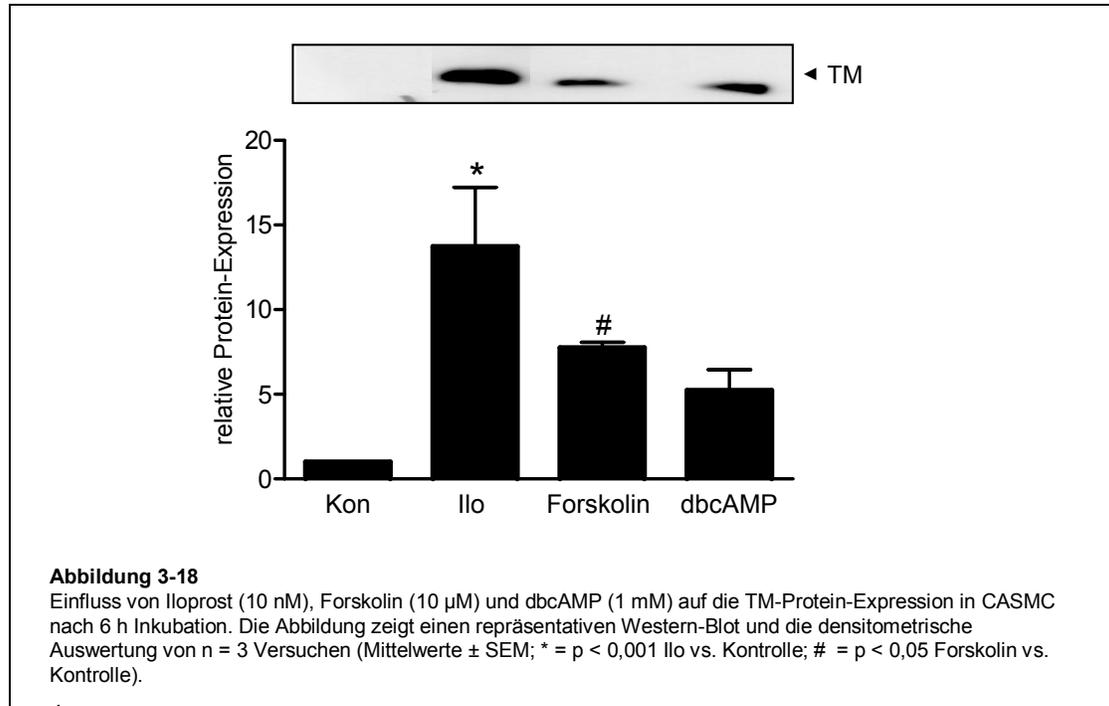
Der nächste Versuchsansatz sollte eine mögliche Interaktion der Gs- und Gi-gekoppelten PG-Rezeptoren in SMC untersuchen. Dafür wurden SMC zunächst mit dem EP₃-Rezeptor-Agonisten M&B 28767 für 0,5 h behandelt, um über eine Aktivierung des EP₃-Rezeptors die AC zu inhibieren. Anschließend wurden die Zellen mit Iloprost, PGE₂, Butaprost und ONO-AE1-329 für 6 h inkubiert. Die Induktion der TM-Expression nach Stimulation mit Iloprost, PGE₂, Butaprost und ONO-AE1-329 konnte durch Vorinkubation mit dem EP₃-Rezeptor-Agonisten M&B 28767 verhindert werden (Abb. 3-17).



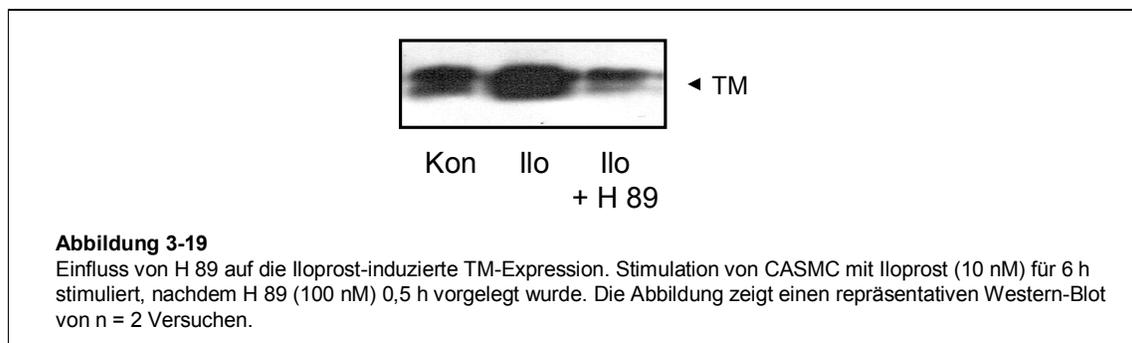
3.1.2.5. Untersuchungen zum cAMP-/PKA-Signaltransduktionsweg

Iloprost bindet an den IP-Rezeptor, der im vaskulären System hauptsächlich an Gs-Proteine gekoppelt ist. Bei Aktivierung der IP-Rezeptors durch seine Agonisten wird durch die Kopplung an Gs die AC stimuliert, die ATP zu dem *second messenger* cAMP umsetzt. Die Erhöhung der cAMP-Konzentration führt weiterhin zur Aktivierung der Serin-/Threonin-Proteinkinase (PKA) und anschließender Phosphorylierung verschiedener Substrate. Da bereits gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung von Gs-gekoppelten PG-Rezeptoren zu einer Induktion der TM-Expression führt, lag es nahe, dass es sich bei der Iloprost-vermittelten Induktion der TM-Expression um einen cAMP-abhängigen Mechanismus handelt. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde der Einfluss von Forskolin, einem direkten Aktivator der AC, sowie des zell-permeablen cAMP-Analogen dibutyryl-cAMP (dbcAMP) auf die Expression von TM im Western-Blot untersucht. Abbildung 3-15 zeigt im Vergleich den Einfluss von Iloprost (10 nM), Forskolin 10 (μM) und dbcAMP (1 mM) auf die TM-Protein-Expression. Neben Iloprost ($13,7 \pm 3,$) führte auch die Inkubation mit Forskolin ($7,8 \pm 0,3$) und dbcAMP ($5,2 \pm 1,2$) zu einer Induktion des TM-Proteins. Diese Induktion durch

Forskolin und dbcAMP, wenn auch schwächer ausgeprägt als die nach Iloprost, ist jedoch ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Iloprost-medierte Regulation von TM über einen cAMP-abhängigen Mechanismus verläuft (Abb. 3-18).



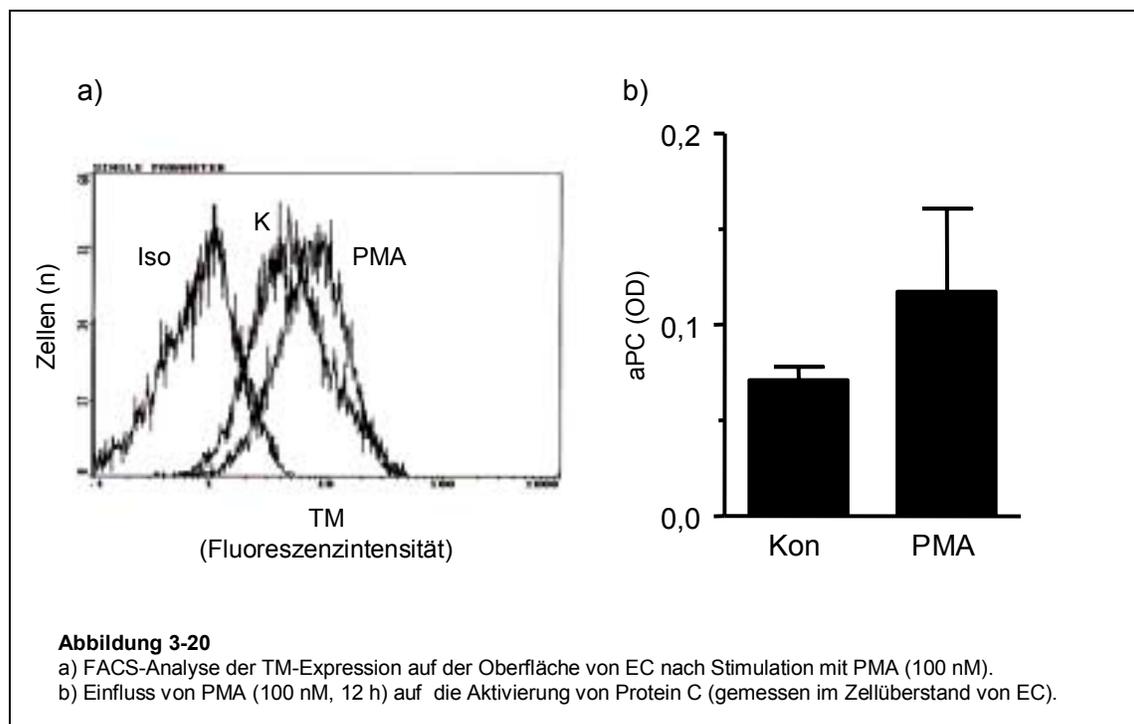
Eine Aktivierung der cAMP-abhängigen Serin-/Threonin-Proteinkinase (PKA) führt zur Phosphorylierung verschiedener Zielproteine. Die Vorbehandlung der Zellen mit dem PKA-Inhibitor H89 verhinderte die Iloprost-induzierte TM-Protein-Expression weitgehend (Abb. 3-19).



3.1.3. Funktionelle Bedeutung von Thrombomodulin

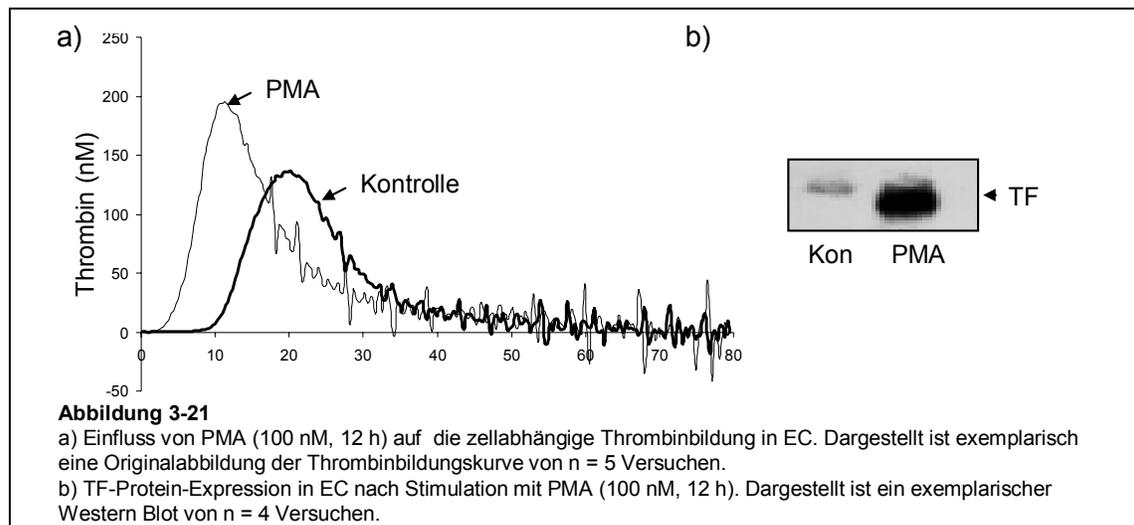
3.1.3.1. Funktionelle Auswirkungen der Thrombomodulin-Expression in humanen EC

Funktionelle Auswirkungen einer erhöhten TM-Expression für die plasmatische Koagulation wurden zur Methodenetablierung zunächst exemplarisch an humanen koronararteriellen Endothelzellen (EC), einem Zellsystem mit hoher TM-Expression (Esmon, 1989), untersucht. Dazu wurde die Aktivierung von PC im Zellüberstand von EC analysiert. Die TM-Expression auf der Zelloberfläche von EC wurde mittels FACS-Analyse untersucht. In Abbildung 13-20 a ist anhand der Rechtsverschiebung der Kurve die erhöhte TM-Expression nach Stimulation mit PMA zu erkennen. Bei gleichzeitig erhöhter TM-Protein-Expression bewirkte PMA ebenfalls einen Anstieg der PC-Aktivierung (Abb. 3-20 b).

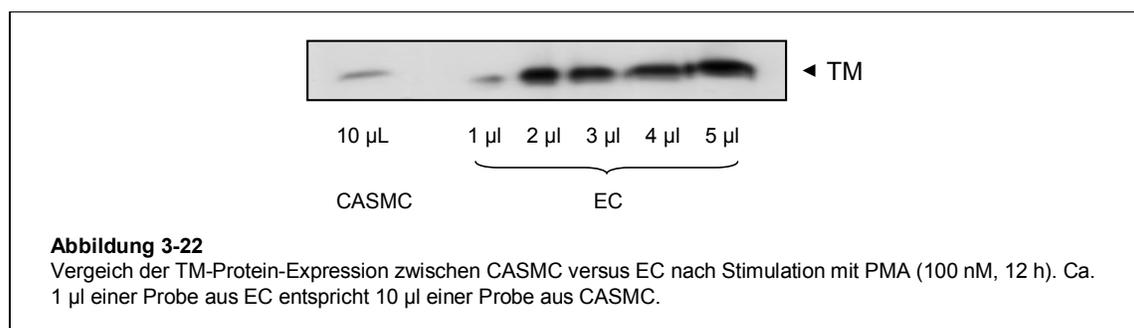


Außerdem wurde der Einfluss einer PMA-Stimulation auf die Thrombinbildung analysiert. Hierzu wurde das endogene Thrombin-Potential (ETP) nach der von Hemker (Hemker et al., 2000) entwickelten Methode untersucht. Diese wurde dahingehend modifiziert, dass als TF-Quelle kultivierte Zellen verwendet wurden, was die simultane Erfassung des Einflusses von

stimulatorischen (z.B. TF) und inhibitorischen Faktoren (z.B. die TM-abhängige PC Aktivierung) ermöglicht. Obwohl die PMA-induzierte TM-Expression (Abb. 3-17 a und 17 b) zu einer erhöhten Aktivierung des antikoagulatorischen PC führte, war die zellabhängige Thrombinbildung trotzdem deutlich erhöht (Abb-3-21 a). Eine erhöhte PC-Aktivierung, bei gleichzeitig induzierter TM-Expression, sollte theoretisch zu einer Reduktion des ETP führen. Eine mögliche Ursache für diesen Befund könnte die gleichzeitig beobachtete Induktion des prokoagulatorisch wirkenden TF durch PMA sein (Abb. 3-21 b).



Im nächsten Versuchsansatz sollte die Aktivierung von PC im Zellüberstand humaner CASMC bestimmt werden. Um zunächst das Verhältnis der TM-Expression von CASMC versus EC abzuschätzen, wurden exemplarisch unterschiedliche Mengen der in Laemmli-Puffer lysierten Proben auf ein Gel aufgetragen und die TM-Expression verglichen. Wie erwartet, war die TM-Expression in CASMC deutlich geringer als in EC (Abb. 3-22).



Die TM-Expression aus 10 µl einer Probe aus CASMC ist zwischen 1 µl und 2 µl einer aus EC stammenden Probe anzusiedeln. Dieser Vergleich, als grober Parameter, würde etwa einer 5-10-fach höheren TM-Expression in EC im Vergleich zu CASMC entsprechen.

3.1.3.2. Funktionelle Auswirkungen der Thrombomodulin-Expression in humanen SMC

Um zu überprüfen, ob eine Iloprost-induzierte TM-Expression auch nachfolgend zu einer gesteigerten PC-Aktivierung führt, wurden CASMC mit Iloprost (10 nM) für 12 h stimuliert und die Aktivierung von PC im Vergleich zu nicht stimulierten Kontrollzellen im Kulturüberstand analysiert. Wie Abbildung 3-23 zu entnehmen ist, zeigte sich, dass die Stimulation mit Iloprost bei gleichzeitig erhöhter TM-Protein-Expression (Abb. 3-23 b) zu einem signifikanten Anstieg der PC-Aktivierung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen führte (Abb. 3-23 a).

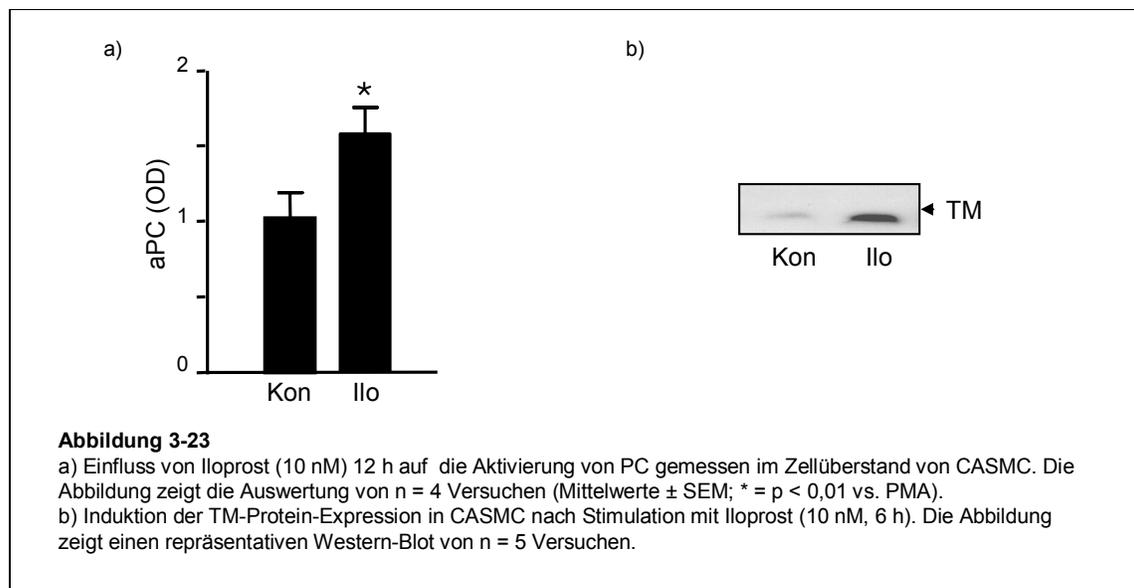


Abbildung 3-23

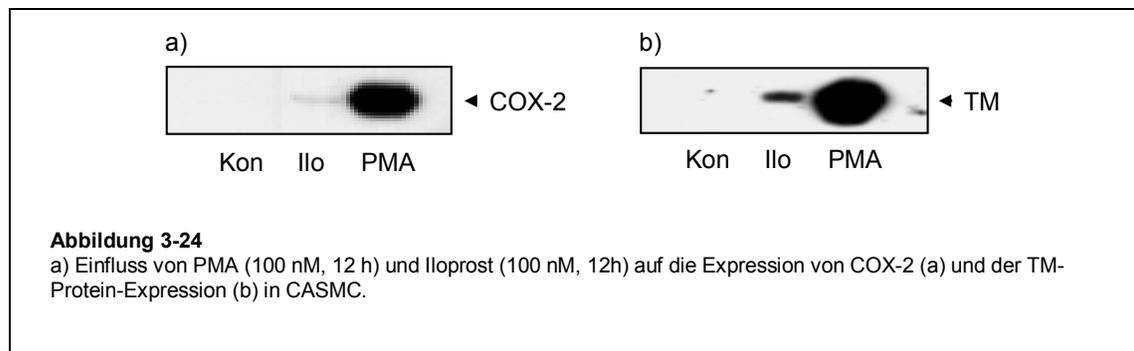
a) Einfluss von Iloprost (10 nM) 12 h auf die Aktivierung von PC gemessen im Zellüberstand von CASMC. Die Abbildung zeigt die Auswertung von n = 4 Versuchen (Mittelwerte \pm SEM; * = p < 0,01 vs. PMA).

b) Induktion der TM-Protein-Expression in CASMC nach Stimulation mit Iloprost (10 nM, 6 h). Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western-Blot von n = 5 Versuchen.

3.2. Einfluss endogener Prostaglandine auf die Thrombomodulin-Expression

3.2.1. Induktion der COX-2

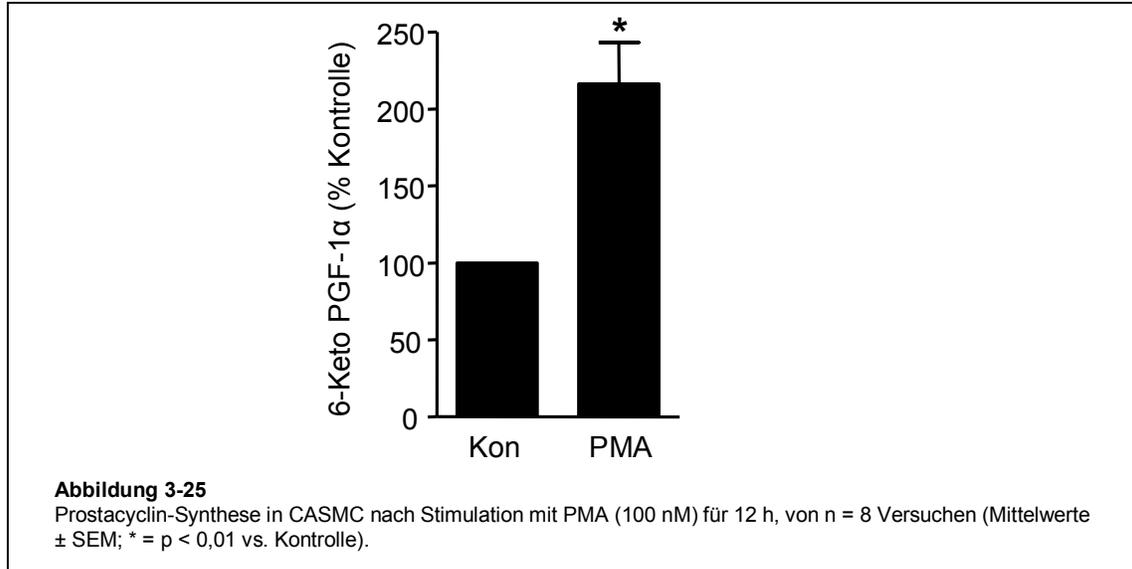
Das Enzym Cyclooxygenase (COX) katalysiert den limitierenden Schritt der Bildung von Prostaglandinen aus Arachidonsäure. Proinflammatorische und mitogene Stimuli wie Endotoxin, Zytokine, Wachstumsfaktoren und Phorbolster führen zu einer Induktion der COX-2 in zahlreichen Zelltypen. Um zu untersuchen, ob endogen gebildete Prostaglandine die Expression von TM modulieren können, wurde zunächst ein starker Induktor der COX-2 gesucht. Es zeigte sich, dass PMA (100 nM) die COX-2-Expression in CASMC, verglichen mit LPS, TNF- α und IL-1 β (Daten nicht gezeigt), deutlich induziert (Abb. 3-24 a). Gleichzeitig bewirkte PMA eine starke Induktion des TM-Proteins (Abb. 3-24 b). Aus diesen Gründen wurde in den folgenden Versuchen PMA als proatherogener Stimulus zur Induktion der COX-2 verwendet.



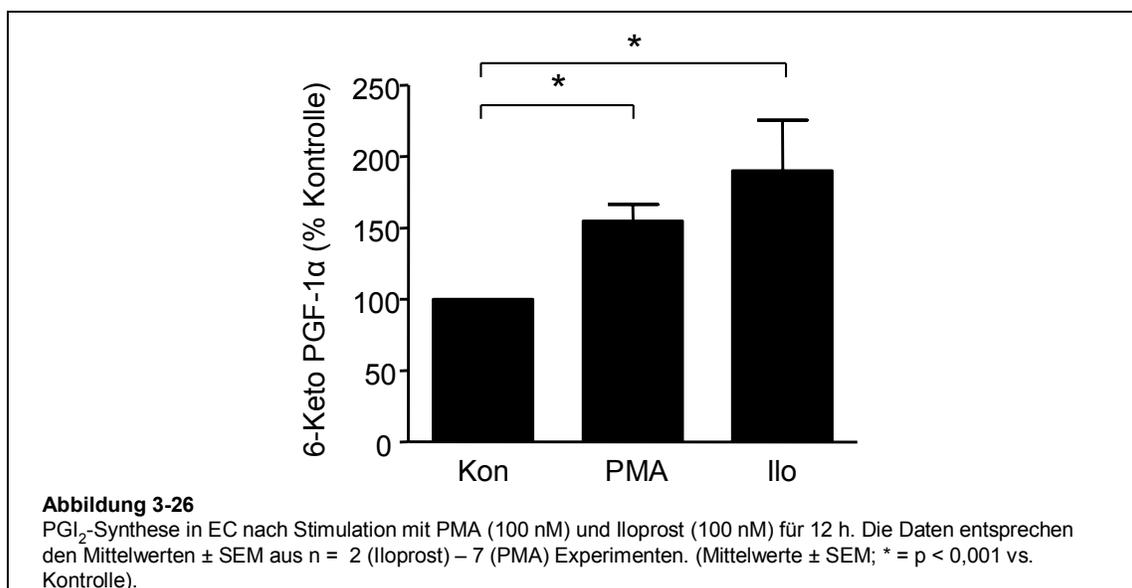
3.2.2. Funktionelle Konsequenzen einer erhöhten COX-2-Expression

Zur Überprüfung von möglichen funktionellen Konsequenzen einer COX-2 Induktion wurde die Synthese von PGI₂ untersucht. Durch die Vinylether-Partialstruktur ist Prostacyclin sehr instabil und durch nichtenzymatische Hydrolyse entsteht mit einer Halbwertszeit von zwei bis drei Minuten unter physiologischen Bedingungen der Hauptmetabolit 6-Keto-PGF_{1 α} (Armstrong, 1996). Daher erfolgte die Bestimmung der PGI₂-Synthese anhand des stabilen Hydrolyseproduktes 6-Keto-PGF_{1 α} im Radioimmunoassay (RIA). Abbildung 3-25 zeigt die

PGI₂-Synthese unter dem Einfluss von PMA (100 nM) und verdeutlicht, dass die Induktion des COX-2-Proteins mit einer deutlichen Steigerung der endogenen Bildung von Prostacyclin einhergeht.



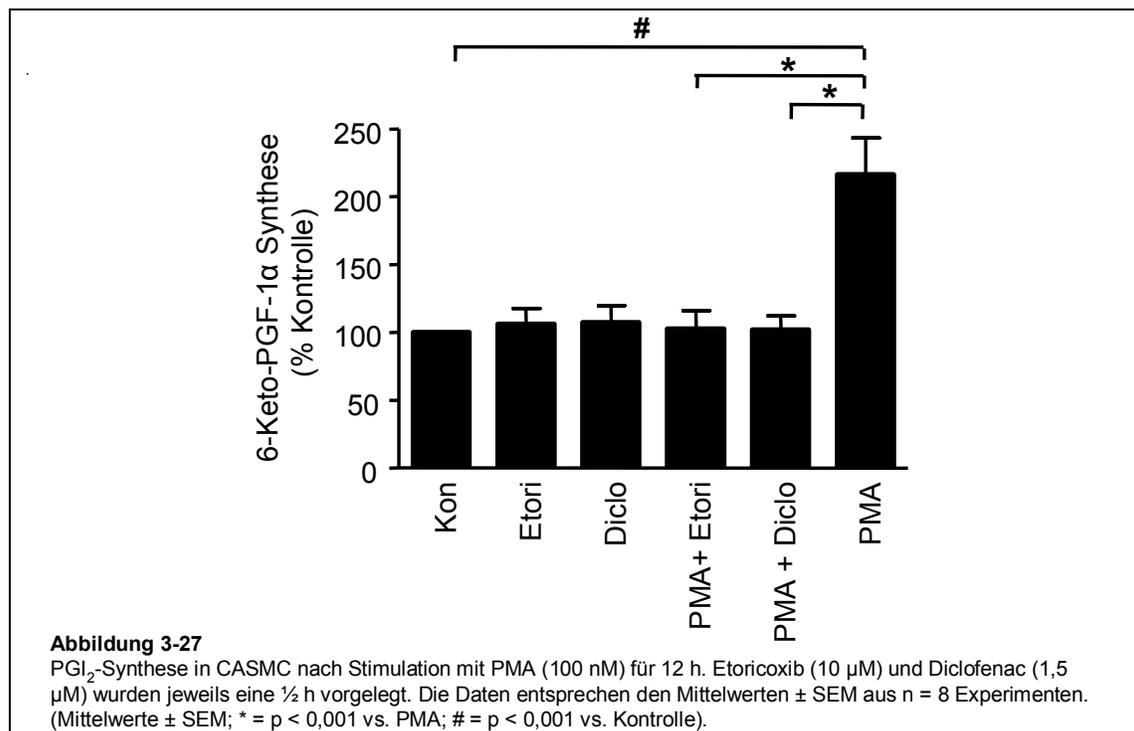
Auch EC wurden hinsichtlich ihrer PGI₂-Synthese nach Stimulation mit PMA (100 nM) und Iloprost (100 nM) untersucht. Wie in Abbildung 3-26 dargestellt konnte eine signifikante Steigerung der Prostacyclin-Synthese, sowohl nach Stimulation mit PMA (155 ± 11 % vs. Kontrolle), wie auch durch Iloprost (190 ± 35 % vs. Kontrolle), nachgewiesen werden.



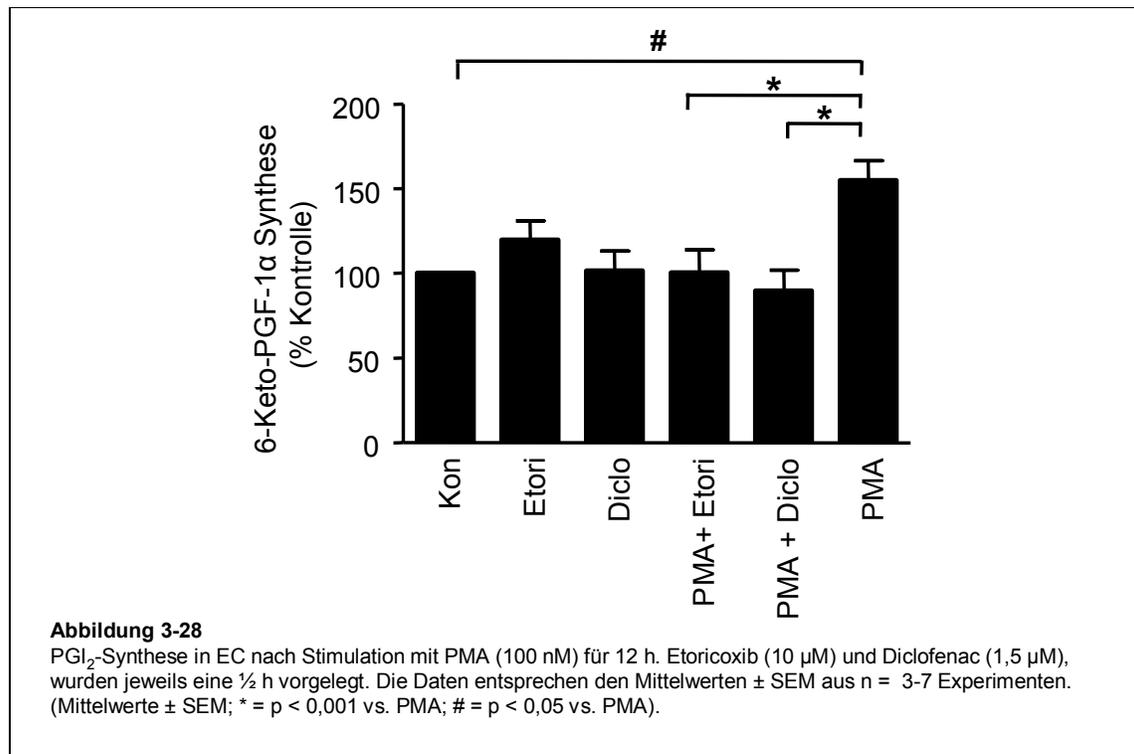
Die absolute 6-Keto-PGF-1 α -Konzentration, gebildet von CASMC, betrug für die Kontrolle (Kontrolle = 100 %) $2,6 \pm 0,3$ ng/ml. Endothelzellen synthetisierten dagegen deutlich weniger Prostacyclin, der Absolutwert für die Kontrolle (100%) betrug hier nur $57,7 \pm 11,9$ pg/ml 6-Keto-PGF-1 α . Nach Literaturangaben synthetisieren primär EC mehr PGI $_2$ als SMC (Smith, 1986). Die Kulturbedingungen und der gewählte Stimulus PMA, der in SMC die COX-2 wesentlich stärker induziert als in EC (Daten nicht gezeigt), könnten eine Erklärung dieser Daten sein. Dies würde die Stimulation sekretorischer SMC in der atherosklerotischen Plaque auch (Chamley-Campbell et al., 1981) zutreffender beschreiben

3.2.3. Einfluss endogener Prostaglandine auf die Thrombomodulin-mRNA-Expression

Wie die bisherigen Arbeiten zeigten, führt PMA zu einer signifikanten Induktion der TM-Gen- und Protein-Expression. Auch ein Anstieg der COX-2-Protein-Expression wurde durch PMA induziert. Um zu überprüfen, ob endogen COX-2-abhängig gebildete Prostaglandine für die TM-Induktion verantwortlich sind wurden CASMC mit dem nicht-selektiven COX-Inhibitor Diclofenac ($1,5 \mu\text{M}$) sowie dem selektiven COX-2-Inhibitor Etoricoxib ($10 \mu\text{M}$) behandelt und die PMA-induzierte PGI $_2$ -Synthese im Kulturüberstand analysiert (Abb. 3-27).



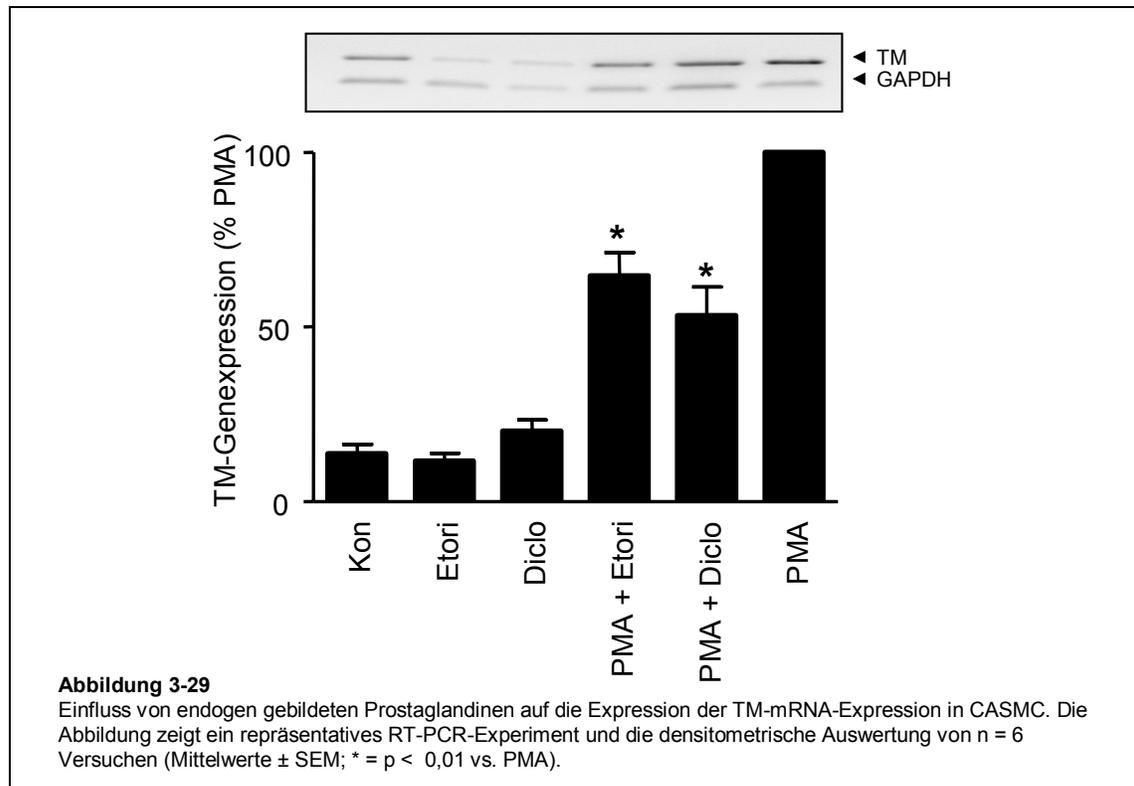
In CASMC wurde die PMA-induzierte Prostacyclin-Synthese durch Diclofenac von 216 ± 24 % (PMA-Stimulation) auf 102 ± 10 % und durch Etoricoxib auf 103 ± 13 % um etwa die Hälfte reduziert. Die Reduktion der PGI₂-Synthese auf Kontrollniveau durch beide COX-Inhibitoren deutet auf eine maßgebliche Beteiligung der COX-2 an der PMA-induzierten PGI₂-Bildung hin (Abb. 3-27).



Die Analyse des stabilen Abbauprodukts 6-Keto-PGF-1α in EC nach Stimulation mit PMA und Behandlung mit den beiden COX-Inhibitoren zeigte eine Reduktion der Prostacyclin-Synthese auch in EC. In EC reduzierte Diclofenac die PMA-induzierte PGI₂-Synthese von 155 ± 12 % auf 90 ± 14 %. Etoricoxib senkte diese auf 100 ± 13 %. Es wurden keine Unterschiede im Ausmaß der Hemmung zwischen den beiden COX-Inhibitoren festgestellt (Abb. 3-28).

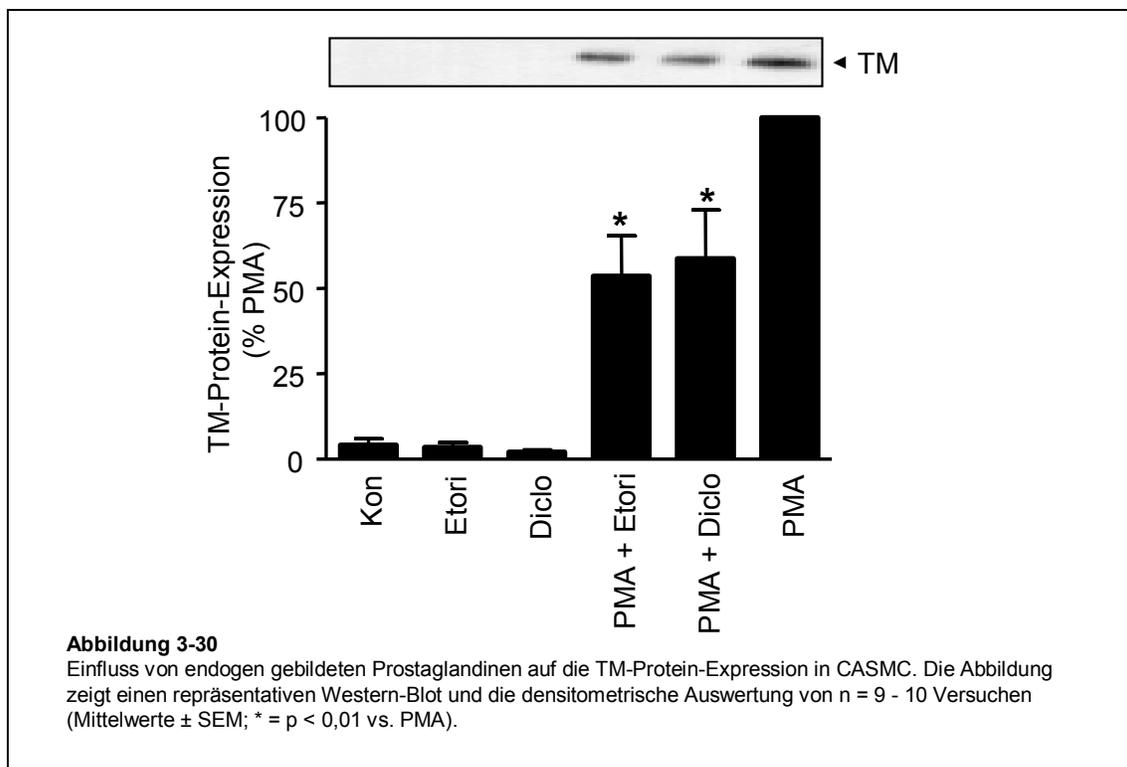
Um zu überprüfen, ob die erhöhte COX-2-Protein-Expression und die induzierte Prostacyclin-Bildung auch Ursache der erhöhten TM-Expression waren, wurden CASMC mit dem nicht-selektiven COX-Inhibitor Diclofenac (1,5 µM) sowie dem selektiven COX-2-Inhibitor Etoricoxib (10 µM) behandelt und die PMA-induzierte TM-mRNA-Expression mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert. Die PMA-induzierte Erhöhung der TM-mRNA konnte sowohl durch den nicht-selektiven COX-Inhibitor Diclofenac (auf $53,2 \pm 8,3$ %), als auch

durch den selektiven COX-2-Inhibitor Etoricoxib (auf $64,7 \pm 6,6$ %) im Vergleich zu PMA signifikant reduziert werden (Abb. 3-29).



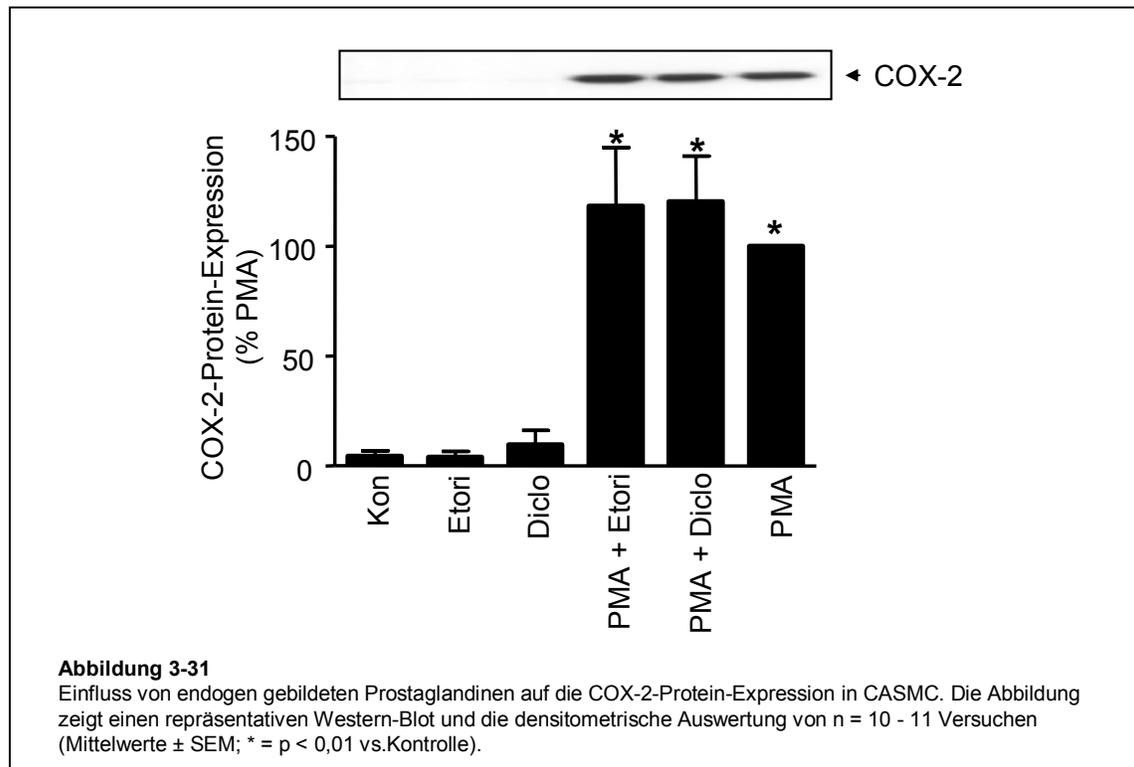
3.2.4. Einfluss endogen gebildeter Prostaglandine auf die TM-Protein-Expression

Bisher konnte gezeigt werden, dass sowohl Etoricoxib als auch Diclofenac bei gleichzeitig reduzierter Prostacyclin-Synthese die PMA-induzierte TM-mRNA-Expression hemmen. Der nachfolgende Versuchsansatz sollte die Frage beantworten, ob sich dieser Effekt auch auf Protein-Ebene zeigen lässt. Dazu wurden CASMC nach dem gleichen Stimulationsschema behandelt und nachfolgend die TM-Protein-Expression im Western-Blot untersucht. Erwartungsgemäß wurde auch die PMA-induzierte TM-Protein-Expression durch Diclofenac und Etoricoxib signifikant reduziert (Abb. 3-30).



Diclofenac reduzierte die TM-Protein-Expression auf $58,7 \pm 14,3$ % und Etoricoxib auf $53,6 \pm 11,9$ %, wobei auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen der hemmenden Wirkung der beiden COX-Inhibitoren festgestellt werden konnte.

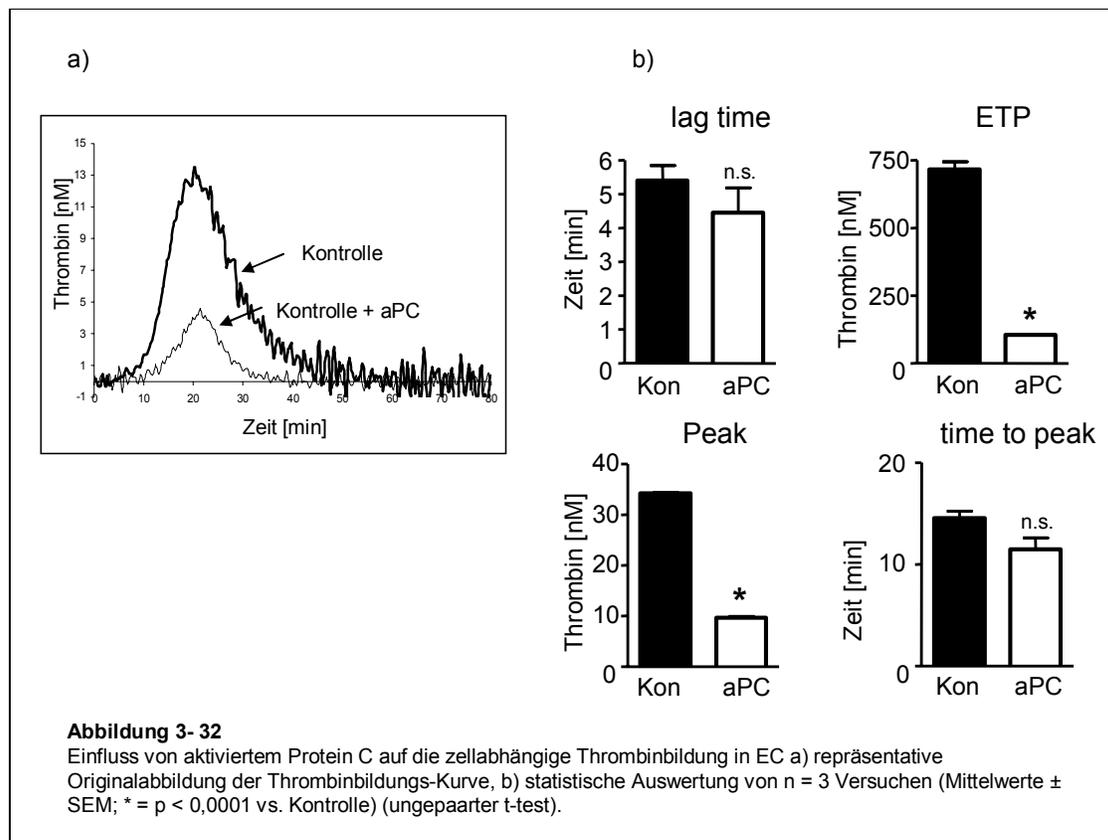
Gleichzeitig wurde in Kontrollversuchen kein Effekt der COX-Inhibitoren auf die PMA-induzierte COX-2-Protein-Expression beobachtet (Abb. 3-31). Dies bedeutet, dass eine Regulation der COX-2-Expression nicht nachweisbar war und damit die TM-Expression nicht beeinflusst.



Sowohl auf RNA- wie auch auf Protein-Ebene konnte nur eine partielle Hemmung der TM-Expression festgestellt werden (Abb. 3-29 und 3-30), die PGI₂-Synthese wurde jedoch durch beide COX-Inhibitoren auf Kontrollniveau reduziert (Abb. 3-27). Diese partielle Hemmung könnte auf den vielfältigen Effekten der PKC beruhen, die über die Beeinflussung zahlreicher PG-unabhängiger Faktoren eine TM-Expression induzieren könnte. Da sich das Ausmaß der Hemmung zwischen dem unselektiven und selektiven COX-Inhibitor nicht signifikant unterschied, kann davon ausgegangen werden, dass maßgeblich die COX-2 an der Regulation von TM beteiligt ist. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass endogene COX-2-gebildete Prostaglandine einen entscheidenden Einfluss auf die Regulation von TM haben.

3.2.5. Einfluss von aktiviertem Protein C (aPC) auf die Thrombinbildung in Endothelzellen

Funktionelle Konsequenz einer erhöhten TM-Expression könnte die Beeinflussung der Thrombinbildung über eine gesteigerte Aktivierung des antikoagulatorisch wirkenden aPC sein. Daher wurde der Einfluss von aPC auf das endogene Thrombinpotential untersucht, um zu überprüfen, ob eine Reduzierung der Thrombinbildung durch aPC nachzuweisen ist. EC, die unter physiologischen Bedingungen keinen TF exprimieren, jedoch wie in Abb. 3-32 in Kultur TF konstitutiv exprimieren, könnte als Modell einer endothelialen Dysfunktion dienen. In diesem Versuchsansatz stellten EC die für diesen Versuch notwendige TF-Quelle dar.

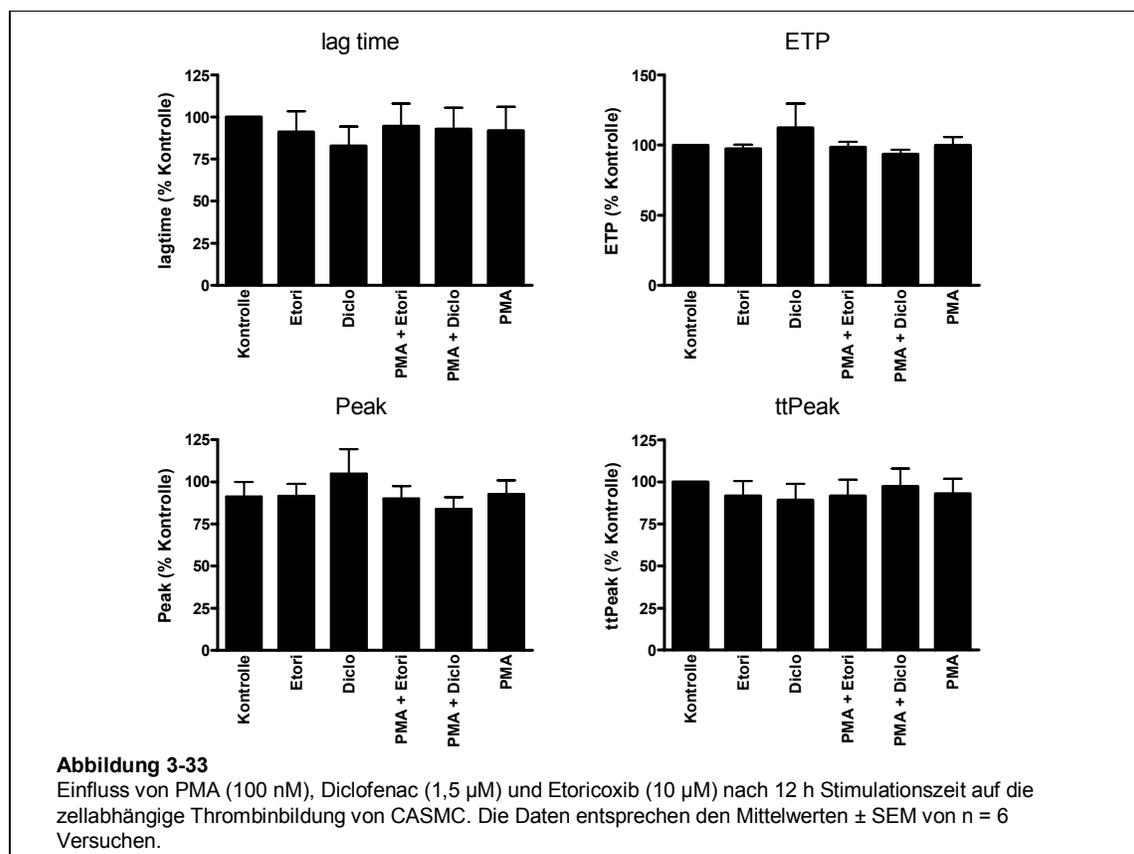


Wie die Auswertung der Thrombinbildung ergab, führte der Zusatz von aPC zu einer deutlichen Reduktion der Thrombinbildung. In Abbildung 3-32 a ist eine Originalabbildung gezeigt, die den Zeitverlauf der Thrombinbildung darstellt. Diese zeigt eine deutliche Hemmung der Thrombinbildung in Anwesenheit von aPC. Die statistische Auswertung ergab eine signifikante Reduktion des ETPs und der Peak-Höhe. Keinen signifikanten Einfluss hatte

aPC dagegen auf die *lag time*, die Zeit bis zum Einsetzen der Thrombinbildung und die Zeit bis zum Erreichen des Peaks (*time to peak* (tpeak)) (Abb. 3-32 b).

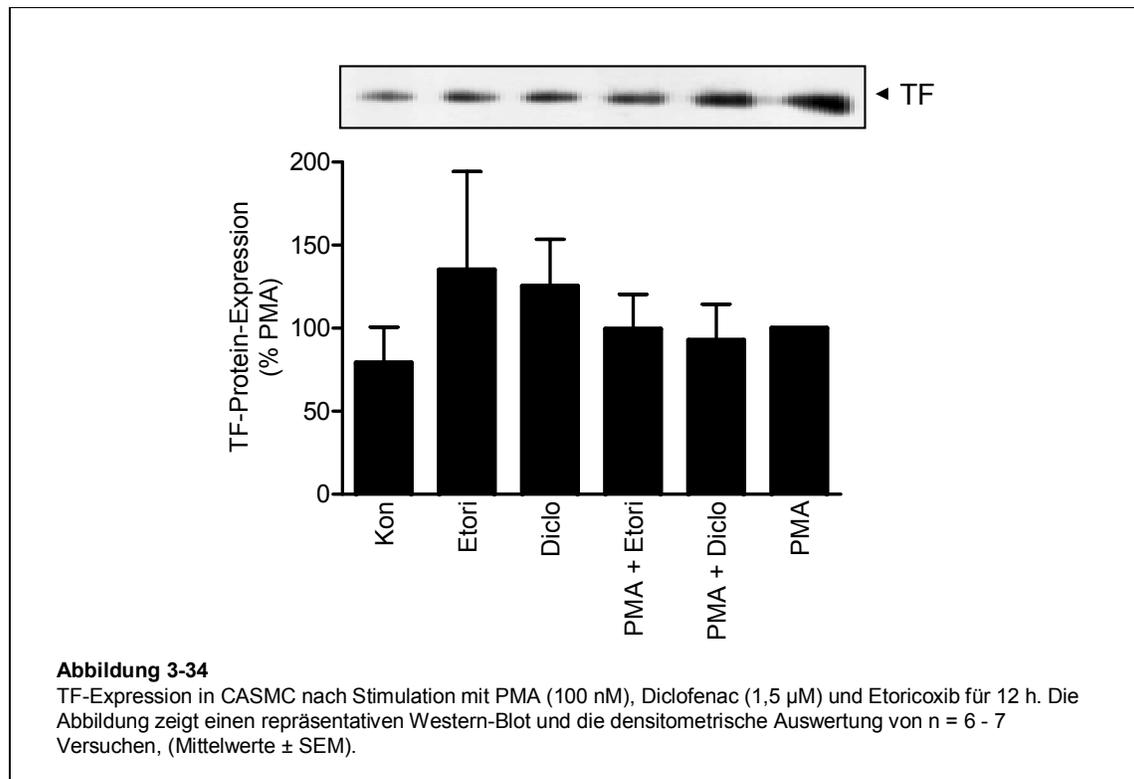
3.2.6. Einfluss von Thrombomodulin auf das endogene Thrombinpotential in glatten Gefäßmuskelzellen

Um zu untersuchen, ob die TM-Expression einen Einfluss auf das ETP hat, wurden CASMC mit PMA (10 nM), Diclofenac (1,5 μ M) und Etoricoxib (10 μ M) stimuliert. Anschließend wurde die zellabhängige Thrombinbildung analysiert (Abb. 3-33).



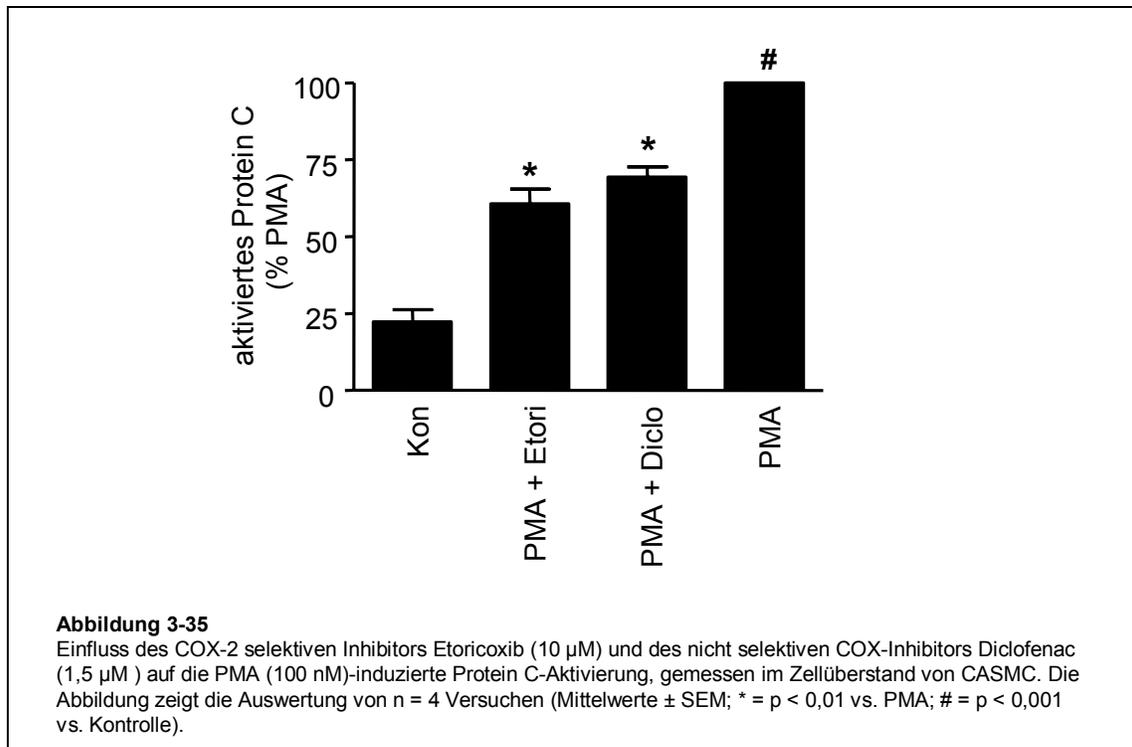
Wie bereits gezeigt, ist die TM-Expression nach Stimulation mit PMA stark induziert und führte gleichzeitig zu einem Anstieg der PC-Aktivierung. aPC hemmt über die Inaktivierung der Koagulationsfaktoren Va und VIIIa die Thrombinbildung, was auch in dem hier verwendeten Versuchsmodell gezeigt werden konnte. Trotz deutlich erhöhter TM-Expression war die zellabhängige Thrombinbildung jedoch unbeeinflusst (Abb. 3-33). Gleichzeitig wurde

zusätzlich die Tissue Faktor (TF)-Expression in CASMC nach Stimulation mit PMA, Diclofenac und Etoricoxib im Western Blot untersucht. Wie in Abbildung 3-34 gezeigt, wiesen CASMC eine hohe Expression des prokoagulatorischen TF auf. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im TF-Expressionsniveau nach Stimulation mit den verwendeten Substanzen festgestellt werden.



3.2.7. Aktivierung von Protein C

Die Iloprost-induzierte TM-Expression führte ebenfalls zu einer gesteigerten Aktivierung von PC (Abb. 3-23). Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob auch endogene, COX-2-abhängig gebildete Prostaglandine die Aktivierung von PC beeinflussen können. Dazu wurden CASMC mit PMA (100 nM), Diclofenac (1,5 µM) und Etoricoxib (10 µM) inkubiert und anschließend die Aktivierung von PC im Zellüberstand untersucht. Die Menge des gebildeten aPC wurde mittels des chromogenen Farbstoffes S-2366 in einer Endkonzentration von 0,75 mM bei 405 nm in einem BioRad Mikroplatten-Reader (Model 550) vermessen (Abb. 3-35).

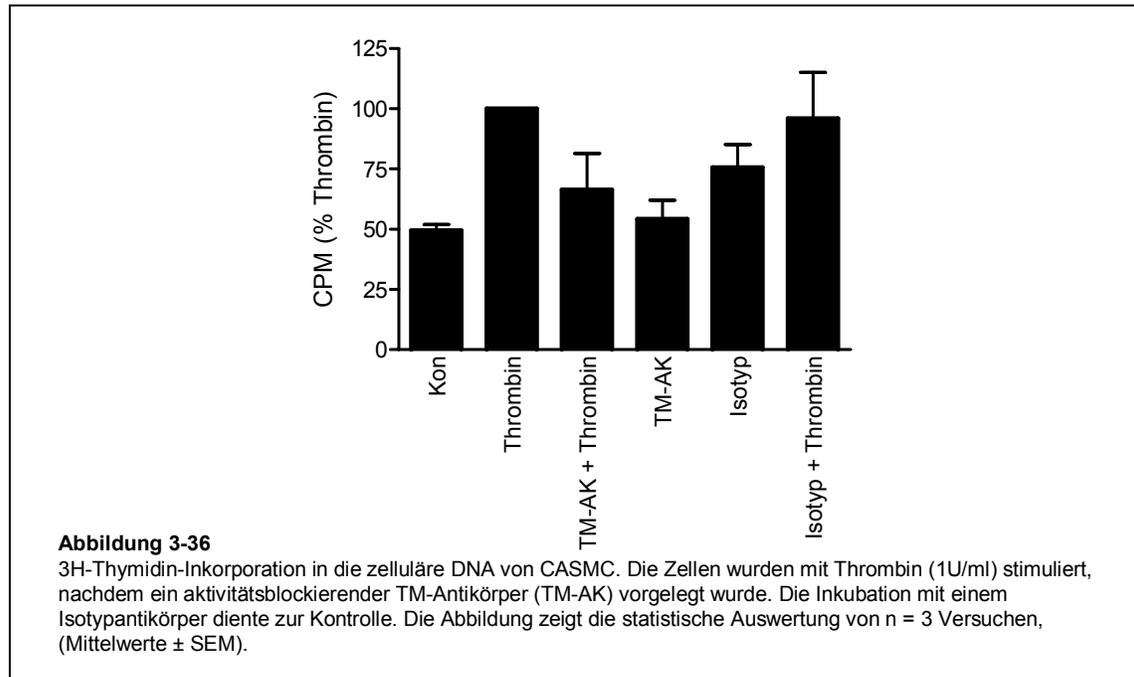


Wie Abbildung 3-35 zu entnehmen ist, führte PMA zu einer signifikanten Induktion von aPC gegenüber der Kontrolle (Kontrolle = 22 ± 4 % versus PMA 100 %). Nicht selektive Inhibition der COX durch Diclofenac führte zu einer signifikanten Reduktion der PC-Aktivierung auf 70 ± 3 %. Die selektive Hemmung der COX-2 durch Etoricoxib führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion von aPC auf 61 ± 5 % gegenüber der PMA-induzierten PC-Aktivierung.

3.2.8. Einfluss von aktivitätsblockierenden Thrombomodulin-Antikörpern auf die DNA-Synthese

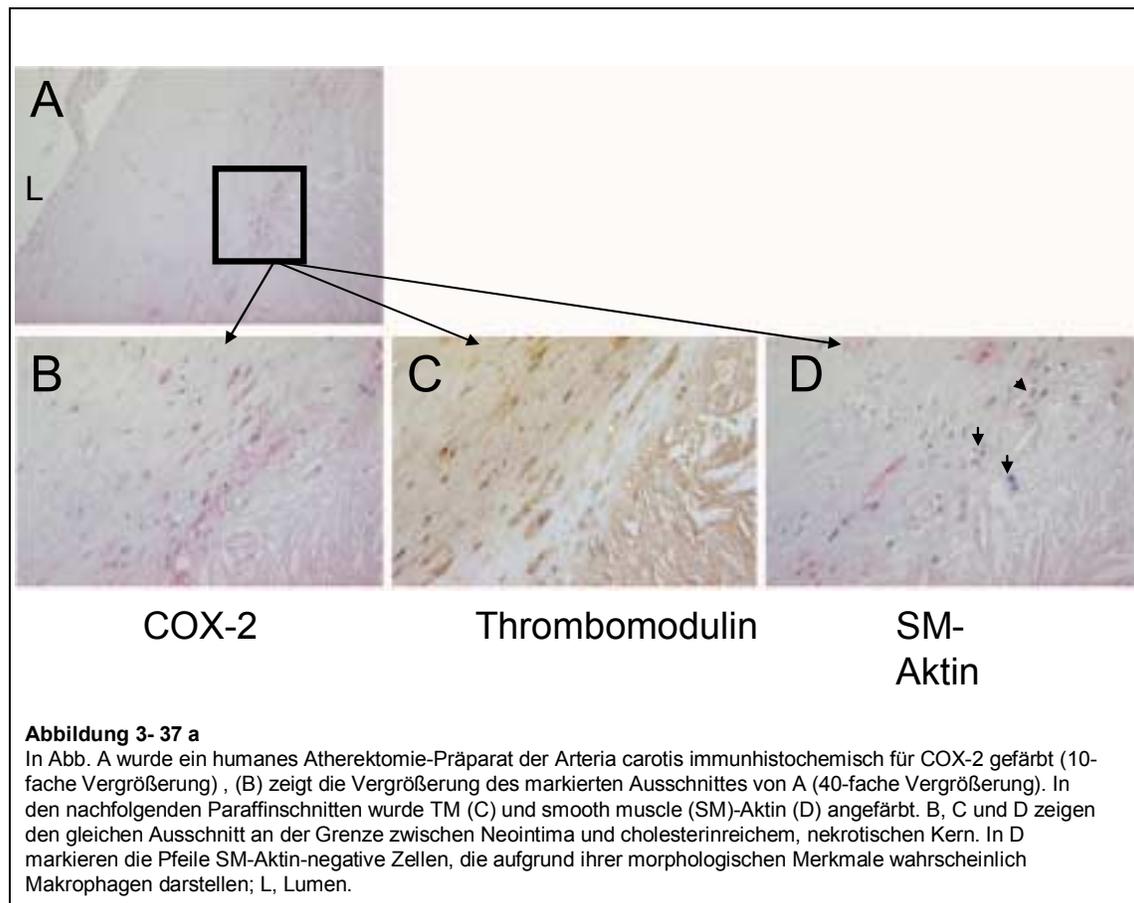
Die diesem Versuch zugrunde liegende Frage war, ob die Bindung von Thrombin an TM die katalytische Wirkung von Thrombin beeinflussen kann. Thrombin ist ein potentes Mitogen für humane SMC (Bretschneider et al., 1997; Zucker et al., 1998). Als Mass für die Zellproliferation wurde die DNA-Synthese anhand des Einbaus von [3H]-markiertem Thymidin in die zelluläre DNA bestimmt. CASMC, die 48 h gehungert wurden, zeigten nur einen sehr geringen Thymidineinbau, der nach Zugabe von Thrombin (1 U/ml) deutlich anstieg (Thrombin = 100%). Die Vorinkubation mit einem aktivitätsblockierenden TM-Antikörper zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Thrombin-induzierte DNA-Synthese

(Abb. 3-36). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass entweder der verwendete Antikörper nicht spezifisch die Bildung von aPC verhindert, oder dass TM, unter den gewählten Versuchsbedingungen, nicht ausreichend exprimiert wird, um die katalytischen Wirkungen von Thrombin zu inhibieren.



3.3. Thrombomodulin-Expression in humanen atherosklerotischen Läsionen

Um zu untersuchen, ob die Prostaglandin-vermittelte Regulation von TM in SMC eine Bedeutung für die Atherosklerose *in vivo* haben könnte, wurden Schnitte von humanen atherosklerotischen Läsionen angefertigt und diese auf TM, einen Marker für SMC (SM-Aktin) und COX-2 untersucht. Alle analysierten Proben enthielten mehrere Bereiche in der Neointima, die positiv für SM-Aktin und TM waren. Außerdem konnte in den SMC COX-2, angrenzend zu den TM-positiven Bereichen nachgewiesen werden, was auf eine Kolokalisation der beiden Proteine hindeutet. Dieses galt sowohl für Bereiche der Neointima nahe dem Lipidkern (Abb. 3-37 b), die neben SMC auch viele SM-negative Makrophagen enthielten, als auch für SMC-reiche Areale der Neointima (Abb. 3-37 a).



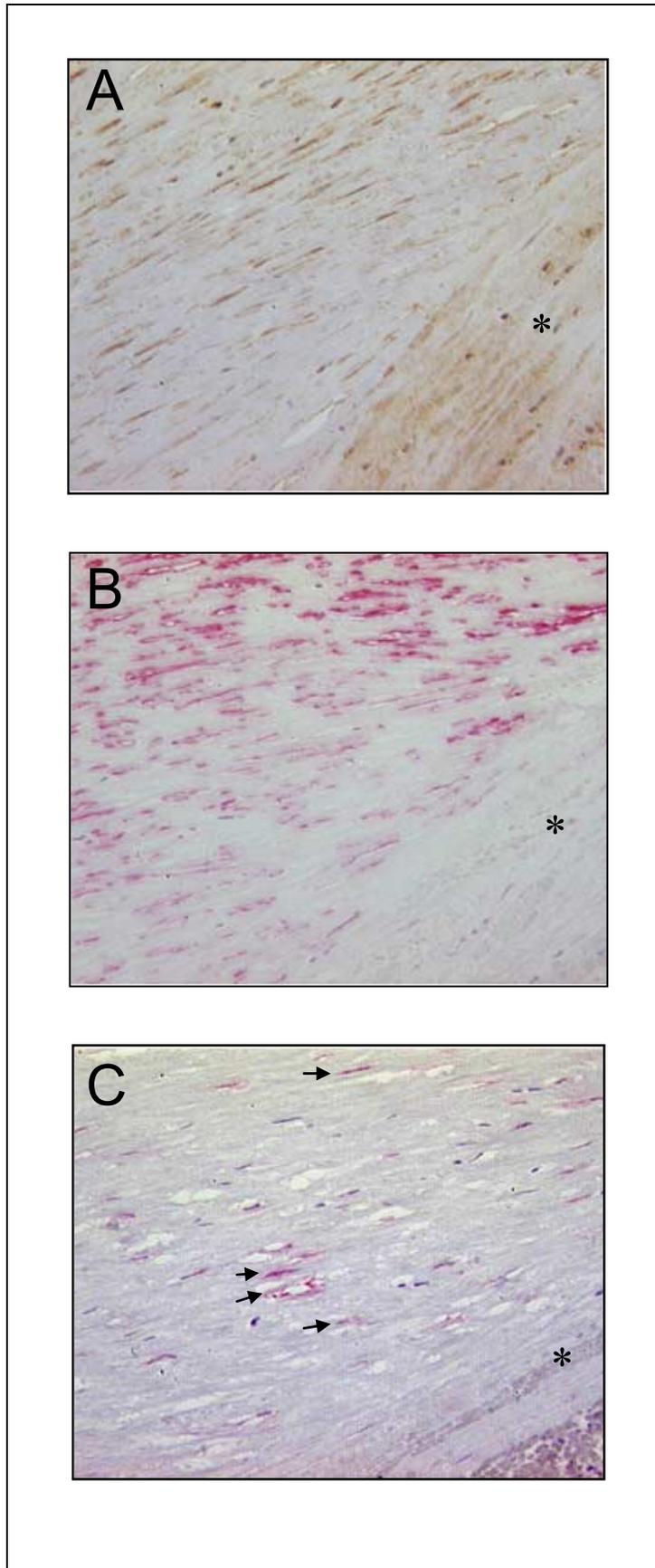


Abbildung 3- 37 b

Abb. A zeigt einen Paraffinschnitt einer humanen Atherektomie-Probe im Bereich der fibrotischen Kappe, die immunhistochemisch für TM angefärbt wurde. In diesem Areal wurde in einem Folgeschnitt (B) smooth muscle (SM)-Aktin angefärbt. (C) zeigt eine COX-2-spezifische Immunfärbung des angrenzenden Schnittes. Die Pfeile deuten auf glatte Gefäßmuskelzellen, bei denen immunhistochemisch COX-2 Expression nachgewiesen werden konnte; 10-fache Vergrößerung.

3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von exogenen Prostaglandinen auf die Expression von TM in humanen CASMC untersucht. Prostaglandine üben ihre physiologische Wirkung über spezifisch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aus. Die Stimulation mit Iloprost, einem synthetischen Prostacyclin-Analagon, führte zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Induktion der TM-Expression. Interessanterweise hatten schon sehr geringe Konzentration von Iloprost, die im Bereich endogen gebildeter Prostacyclin-Konzentrationen liegen, einen deutlichen stimulierenden Effekt. Auch die Inkubation mit Cicaprost, einem weiteren Prostacyclin-Analagon, führte zu einer Aufregulation der TM-Protein-Expression. PMA, ein Phorbolster und Aktivator der PKC, induzierte ebenfalls die TM-Expression, die im Vergleich zu Iloprost stärker ausgeprägt war. Neben Prostacyclin ist Prostaglandin E₂ (PGE₂) das Hauptprodukt der COX-katalysierten Prostaglandin-Synthese im vaskulären System. Als Agonist an EP-Rezeptoren führte auch PGE₂ zu einem Anstieg der TM-Expression in CASMC, welcher jedoch schwächer gegenüber der Iloprost-vermittelten war. Die einzelnen EP-Rezeptoren sind jedoch an unterschiedliche G-Proteine gekoppelt, die wiederum verschiedene Signalwege aktivieren. Während die Stimulation der Gs-gekoppelten EP₂- und EP₄-Rezeptoren mit Butaprost und ONO-AE1-329 zu einem Anstieg von TM führte, wurde nach Stimulation des Gi-gekoppelten EP₃-Rezeptors durch M&B 28767 die TM-Expression reduziert. Die Induktion der TM-Expression nach Stimulation mit Iloprost, PGE₂, Butaprost und ONO-AE1-329 konnte durch Vorinkubation (0,5 h) mit dem EP₃-Rezeptor-Agonisten M&B 28767 verhindert werden. Die Aktivierung von Gs-gekoppelten Rezeptoren führt zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Daher lag die Vermutung nahe, dass die TM-Expression über diesen *second messenger* verläuft. Die Induktion der TM-Expression nach Stimulation mit Forskolin und dbcAMP bestätigten diese Hypothese. Die Hemmung der Iloprost-induzierten TM-Expression durch den PKA-Inhibitor H 89 wies auf die Beteiligung der PKA bei der Vermittlung der TM-Expression hin. Um zu überprüfen, ob eine Iloprost-induzierte TM-Expression auch nachfolgend zu einer gesteigerten PC-Aktivierung führt, wurden CASMC mit Iloprost stimuliert und die Aktivierung von PC im Vergleich zu nicht stimulierten Kontrollzellen im Kulturüberstand analysiert. Die Stimulation mit Iloprost führte, bei gleichzeitig erhöhter TM-Protein-Expression, zu einem signifikanten Anstieg der PC-Aktivierung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Ob auch endogen COX-2-abhängig gebildete Prostaglandine einen Einfluss auf die TM-Expression haben,

wurde im zweiten Teil diese Arbeit untersucht. Stimulation mit PMA zeigte nicht nur eine deutliche Induktion der TM-Expression, sondern induzierte gleichzeitig auch die COX-2-Expression. Ebenso war ein deutlicher Anstieg der PC-Aktivierung nachweisbar. Um die Beteiligung der COX-1 und COX-2 an der PMA-vermittelten TM-Induktion zu untersuchen, wurden CASCs mit Diclofenac und Etoricoxib behandelt. Sowohl durch Diclofenac wie auch durch Etoricoxib wurde die PMA-induzierte Prostacyclin-Synthese auf das Niveau unstimulierter Kontrollzellen reduziert. Auch die PMA-vermittelte TM-Gen- und Protein-Expression wurde durch beide COX-Inhibitoren um ca. 40% gehemmt. Da keine Unterschiede des hemmenden Effektes zwischen den beiden COX-Inhibitoren festgestellt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass maßgeblich die COX-2 an der Vermittlung der TM-Expression beteiligt ist. Eine funktionelle Auswirkung einer erhöhten TM-Expression könnte die Beeinflussung der Thrombinbildung über eine gesteigerte Aktivierung des antikoagulatorisch wirkenden aPC sein. Daher wurde der Einfluss einer erhöhten TM-Expression auf das endogene Thrombinpotential untersucht. Trotz erhöhter TM-Expression wurde kein reduzierender Effekt auf die Thrombinbildung festgestellt. Die ebenfalls gleichzeitig beobachtete Induktion des prokoagulatorisch wirkenden TF könnte eine mögliche Erklärung für die fehlende Wirkung von TM sein. Die Untersuchung der PC-Aktivierung im Zellkulturüberstand zeigte nach PMA-Stimulation eine signifikante Induktion von aPC gegenüber der Kontrolle. Nicht selektive Inhibition der COX durch Diclofenac führte zu einer signifikanten Reduktion der PC-Aktivierung um ca. 30 %. Die selektive Hemmung der COX-2 durch Etoricoxib führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion von aPC um ca. 40 % gegenüber der PMA-induzierten PC-Aktivierung. Damit konnte gezeigt werden, dass endogen COX-2-abhängig gebildete Prostaglandine nicht nur die TM-Expression induzieren, sondern auch zu einer Aktivierung von PC führen.

In immunhistochemischen Untersuchungen an humanem Gewebe, welches bei einer Atherektomie aus der Arteria carotis entnommen wurde, konnte in dieser Arbeit die TM-Expression in SMC atherosklerotischer Läsionen gezeigt werden. Interessanterweise zeigten SMC eine positive Färbung für COX-2 in den Bereichen, in denen auch TM nachweisbar war. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass über den COX-2-Syntheseweg endogen gebildete Prostaglandine in einer autokrinen oder parakrinen Weise die TM-Expression stimulieren.

4. DISKUSSION

Vaskuläre EC und SMC synthetisieren eine Vielzahl von Prostaglandinen. Durch die PG G₂/H₂-Synthase (Cyclooxygenase), welche in einer konstitutiven Form, der COX-1 und in einer induzierbaren Form, der COX-2 vorliegt, werden anschließend durch die Aktivität der spezifischen Synthasen die einzelnen Prostaglandine wie PGI₂ und PGE₂ gebildet (Schrör, 1984; Smith et al., 2000). Vasodilatierende Prostaglandine, wie PGE₂ und PGI₂ haben vielfältige Wirkungen im vaskulären System, wie die Regulation des Gefäßtonus, der Thrombozytenfunktion und der inflammatorischen Antwort (Vane and Botting, 1995; Smith et al., 2000). PGI₂ ist der stärkste endogene Inhibitor der Plättchenaggregation. Nicht nur das Aneinanderheften der Plättchen untereinander wird unterdrückt, auch bereits bestehende Aggregate werden durch PGI₂ wieder aufgelöst, *in vitro* wie auch *in vivo* (Moncada et al., 1976; Szczeklik et al., 1978; Ubatuba et al., 1979). Prostacyclin inhibiert die Plättchenaggregation nach Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche, welche daraufhin die Adenylatcyclase aktivieren und zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels führen (Gorman et al., 1977; Tateson et al., 1977). Bislang wurde angenommen, dass die antithrombotischen Effekte des PGI₂ ausschließlich auf dessen inhibitorische Wirkung auf die Plättchenfunktion zurückzuführen sind. Inhalt dieser Arbeit war die Untersuchung eines weiteren Mechanismus der antikoagulatorischen Wirkung des PGI₂. Mit Hilfe der DNA-Microarray-Analyse wurde, in Arbeiten aus dem eigenen Labor, eine Aufregulation der TM-mRNA-Expression in koronararteriellen Zellen gezeigt (Meyer-Kirchrath et al., 2004). TM, ein membranständiger Zelloberflächen-Rezeptor für Thrombin, ist maßgeblich an der Aktivierung von Protein C beteiligt (Dahlback und Villoutreix, 2003; Weiler und Isermann, 2003) und spielt somit eine entscheidende Rolle für die natürlichen Hemmung der Blutgerinnung. Die Fragestellung dieser Arbeit beruht auf der Hypothese, dass vasodilatierende Prostaglandine (PGI₂, PGE₂) die plasmatische Koagulation über eine Erhöhung der TM-Expression in SMC regulieren. Dies ist deswegen von besonderer Bedeutung, weil SMC nach Endothelschädigung in unmittelbarem Kontakt mit dem gerinnenden Blut kommen und daher ihr pro- oder antikoagulatorisches Potential für die Thrombinbildung entscheidend ist.

4.1. Thrombomodulin-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen

Der erste Teil der Arbeit befasste sich mit der Regulation von TM durch das stabile PGI₂-Mimetikum Iloprost in SMC unterschiedlicher Herkunft.

SMC aus der Vena saphena und der Koronararterie wurden mit Iloprost behandelt, um über die Aktivierung der AC und eine anschließende Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels TM zu induzieren. Die Zeitabhängigkeit der Induktion von TM wurde mittels RT-PCR und Western-Blot analysiert. Iloprost bewirkte eine transiente Expression der TM-mRNA- und Protein-Expression mit einem Maximum zwischen 3 und 6 h. Nach ca. 16-24 h kehrte die Expression von TM wieder auf Kontrollniveau zurück. Hinweise für eine Prostaglandin-abhängige Regulation von TM in SMC sind auch in der Literatur zu finden. So konnte eine Arbeitsgruppe zeigen, dass Beraprost, ein weiteres Prostacyclin-Analogon, einen stimulierenden Effekt auf die TM-Expression in humanen Endothelzellen hat. Im Vergleich zu Prostacyclin erhöht Beraprost den cAMP-Spiegel wie auch die TM-Expression anhaltender (Kainoh et al., 1991), was auf eine Beteiligung dieses *second messenger* bei der TM-Regulation hinweist. Unterstützt wird diese Schlussfolgerung durch Befunde, die zeigen, dass in bovine SMC (Soff et al., 1991) und SMC der Ratte (Traynor et al., 1995) TM cAMP-abhängig aufreguliert ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte ebenso eine Induktion von TM mittels des Phorbolesters PMA gezeigt werden. Im Vergleich zu PMA war die Iloprost-induzierte TM-Expression jedoch deutlich schwächer ausgeprägt. Phorbolster sind Tumorpromotoren, die aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit DAG die PKC direkt aktivieren. In der vorliegenden Arbeit wurde PMA zur Nachahmung von PKC-abhängigen proatherogenen, inflammatorischen Stimuli zur Induktion der COX-2 verwendet. In Endothelzellen konnte bereits der stimulierende Effekt von PMA auf die TM-Expression gezeigt werden (Hirokawa und Aoki, 1991). Diese Befunde konnten in der vorliegenden Arbeit auch für humane vaskuläre SMC bestätigt werden. PMA induzierte eine transiente transkriptionelle Aufregulation der TM-Expression. Im Sinne der Hypothese, dass die TM-Induktion auf einer erhöhten COX-abhängigen Prostacyclin-Synthese beruht, könnte die ebenso transient verlaufende Induktion der COX-2 (Debey et al., 2003) eine mögliche Erklärung für die transiente TM-Expression sein. Dies ist ein typisches Merkmal für sogenannte *immediate early* Gene, zu deren Familie die COX-2 gehört (Herschman, 1991). Eine Desensibilisierung der PKC bei andauernder PMA-Stimulation (Rapoport et al., 1995; Beasley, 1997) wie auch die Desensibilisierung des

IP-Rezeptors nach anhaltender Iloprost-Stimulation (Nilius et al., 2000) könnte zum transient verlaufenden Expressionsmuster von TM beitragen.

Es ist bekannt, dass die COX-2 durch zahlreiche Faktoren wie Zytokine (Maier et al., 1990) Endotoxin, Interleukine (Ristimäki et al., 1994), Wachstumsfaktoren (Habenicht et al., 1985; O'Banion et al., 1992) und auch Phorbol ester (Kujubu DA, 1991; Inoue et al., 1995) induziert werden kann. Da PMA ein Stimulus mit vielfältigen Wirkungen ist, wurde angestrebt, die COX-2 möglichst selektiv zu induzieren. Eine Arbeit von Bishop-Bailey und Kollegen zeigte, dass die Stimulation der COX-2 durch Kombination von TNF- α und IL-1 β zu einem Anstieg der COX-2-abhängigen Prostaglandin-Synthese führte. Ein Anstieg der Prostacyclin-Bildung, nach Stimulation mit IL-1 β und TNF- α wurde auch in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Während sowohl TNF- α als auch IL-1 β zu einer Induktion des COX-2-Proteins führten und auch konsequenterweise die Prostacyclin-Bildung, gemessen als 6-Keto-PGF1 α , im Zellüberstand anstieg, konnte jedoch keine Induktion der TM-Expression nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit dem Befund, dass eine Stimulation mit IL-1 β und TNF- α zu einer Reduktion der TM-Expression wie auch zu einer Reduktion der PC-Aktivierung in Endothelzellen führt (Cadroy et al., 1997). Eine Erklärung für die fehlende Wirkung der COX-2-abhängig gebildeten Prostaglandine könnte die TNF- α induzierte Unterdrückung der Transkription des TM-Gens, die anschließende Degradation des TM-Transkripts, oder eine Internalisierung von TM, wie es in Endothelzellen gezeigt wurde sein (Moore et al., 1989; Lentz et al., 1991). Die TNF- α -sensitive Region befindet sich auf der TM-Promotor-Region 1 und ist abhängig von dem Vorhandensein einer TATA-Box (Conway und Rosenberg, 1988; Yu et al., 1992).

4.2. Untersuchungen zur Signaltransduktion

Prostaglandine üben ihre Wirkung über die Aktivierung spezifischer Prostaglandin (PG)-Rezeptoren aus. Interessant waren in diesem Zusammenhang der IP-Rezeptor, sowie die PG-Rezeptoren der E-Reihe. In den hier verwendeten SMC konnte die Expression des IP-Rezeptors wie auch der EP-Rezeptoren 2, 3 und 4 nachgewiesen werden. Durch Stimulation mit spezifischen Agonisten wurde die Beteiligung dieser Rezeptoren an der Vermittlung der TM-Expression untersucht. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass Iloprost über den IP-Rezeptor zu einem Anstieg von intrazellulärem cAMP führt. Über die Kopplung an ein

stimulatorisches G-Protein (Gs) wird die Adenylatcyclase aktiviert, die nachfolgend aus ATP cAMP bildet. Auch die Kopplung an ein Gq-Protein ist bekannt. Letzteres führt über eine Aktivierung der Phospholipase C zu einem Anstieg von DAG und IP₃ und anschließend zu einer Aktivierung der PKC (Schwaner et al., 1992; Oka et al., 1993). Die hier untersuchten SMC zeigten schon bei sehr geringen Iloprost-Konzentrationen, die im Bereich des endogen gebildeten Prostacyclins liegen, einen deutlichen Anstieg der TM-Protein-Expression. Dies macht wahrscheinlich, dass hauptsächlich der Gs/cAMP-abhängige Mechanismus an der Vermittlung der Induktion beteiligt ist. Eine Aktivierung des Gq-gekoppelten Rezeptors ist erst bei Einsatz höherer Konzentrationen zu erwarten (Schwaner et al., 1992). Dies könnte auch eine Erklärung der schwächeren TM-Expression in CASMC nach Stimulation mit einer Iloprost-Konzentration von 100 nM im Vergleich zu der durch 10 nM induzierten TM-Expression sein. Einen weiteren Hinweis für diese Hypothese ergab die Induktion der TM-Expression nach Stimulation mit Cicaprost, einem sehr spezifischen Agonisten des IP-Rezeptors, dessen Stimulation konzentrationsabhängig ebenso zu einer Induktion von TM führte. Für die E-Typ-Rezeptoren sind neben PGE₂ verschiedene natürliche und synthetische Agonisten bekannt (Janssen und Tazzeo, 2002). Auch PGE₂, ein natürlicher Agonist von Prostaglandin-Rezeptoren der E-Reihe, induzierte konzentrationsabhängig die TM-Expression. Im Vergleich zu der TM-Induktion nach Stimulation mit Iloprost war der stimulierende Effekt von PGE₂ deutlich schwächer ausgeprägt. PGE₂ ist ein Agonist der EP-Rezeptoren 1-4, die an unterschiedliche G-Protein-Subtypen gekoppelt sind und verschiedene intrazelluläre Signalwege aktivieren. An ein stimulatorisches G-Protein(Gs) gekoppelt sind die EP-Rezeptoren 2 und 4, während der EP₃-Rezeptor an ein inhibitorisches G-Protein (Gi) koppelt. Der primäre Effektor dieser G-Proteine ist die Adenylatcyclase, die durch die α Untereinheit des Gs-gekoppelten G-Proteins aktiviert wird und ATP zu cAMP umsetzt, jedoch Gi-abhängig gehemmt wird. Die EC₅₀-Werte für die jeweiligen Gs-gekoppelten Rezeptoren von Iloprost und PGE₂ sind vergleichbar und liegen zwischen 11-20 nM. Der EC₅₀-Wert von PGE₂ für den Gi-gekoppelten EP₃-Rezeptor liegt jedoch niedriger bei 1 nM (Narumiya et al., 1999), was eine Erklärung für die so schwach ausgeprägte Induktion von TM in vergleichbaren Konzentrationen sein könnte. PGE₂ als Agonist sowohl der Gs-gekoppelten Rezeptoren (EP₂₊₄) führt, über deren Aktivierung, zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration wie auch durch gleichzeitige Aktivierung des Gi-gekoppelten EP₃-Rezeptors zu einer Hemmung der Bildung von cAMP. Wie in dieser Arbeit gezeigt, induzierten spezifische Agonisten der Gs-gekoppelten EP₂- und des EP₄-Rezeptoren

die TM-Expression. Hierzu wurde als spezifischer Agonist des EP₂-Rezeptors Butaprost verwendet und ONO-AE1-329 zur Stimulation des EP₄-Rezeptors. Stimulation dieser PG-Rezeptoren führte, wahrscheinlich über eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration, zu einer deutlichen Induktion der TM-Protein-Expression. Zur funktionellen Untersuchung des Gi-gekoppelten EP₃-Rezeptors wurde der spezifische Agonist M&B 28767 verwendet. Nach Stimulation humaner SMC mit M&B 28767 zeigte sich eine Reduktion der basalen TM-Expression. Interessanterweise konnte sogar die Iloprost, Butaprost und ONOAE induzierte TM-Expression durch gleichzeitige Stimulation des EP₃-Rezeptors reduziert werden. Auch konnte gezeigt werden, dass Agonisten Gs-gekoppelter PG-Rezeptoren, wie Iloprost, Cicaprost, Butaprost und ONOAE-1329, zu einer Induktion der TM-Expression in kultivierten SMC der Koronararterie und der Vena saphena führen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es zwischen den Gs-gekoppelten und Gi-gekoppelten PG-Rezeptoren zu einem funktionellen Antagonismus kommt. Die Induktion der TM-Expression nach Stimulation mit Substanzen, die zu einer Erhöhung des *second messenger* cAMP führen, weisen auf dessen Beteiligung an der TM-Regulation hin. Auch die Stimulation mit Forskolin, einem direkten Aktivator der AC und dbcAMP, einem membrangängigen cAMP-Analogon, bestätigten die zentrale Rolle des *second messenger* cAMP bei der Regulation von TM. Die cAMP-abhängige Transkriptions-Aktivierung kann z.B. durch die Aktivator Proteine CREB (*CRE binding protein*) und CREM (*cAMP responsive element modulator*) vermittelt werden, die nach PKA-abhängiger Phosphorylierung (Aktivierung) an den Promotor des entsprechenden Gens binden und eine Aktivierung der Transkription bewirken (Lalli und Sassone-Corsi, 1994; Lamas et al., 1996). In der 3'-untranslatierten Region des humanen TM-Gens befindet sich ein solches funktionelles *cAMP responsive element* (Tazawa et al., 1994a). Auch in Endothelzellen und in embryonalen Karzinomzellen ist eine cAMP-abhängige Induktion von TM bekannt (Weiler-Guettler et al., 1992; Archipoff et al., 1993). Die Reduktion der Iloprost-induzierten TM-Expression durch Hemmung durch einen PKA-Inhibitor H 89 bestätigte eine Beteiligung des cAMP/PKA Signaltransduktionsweges.

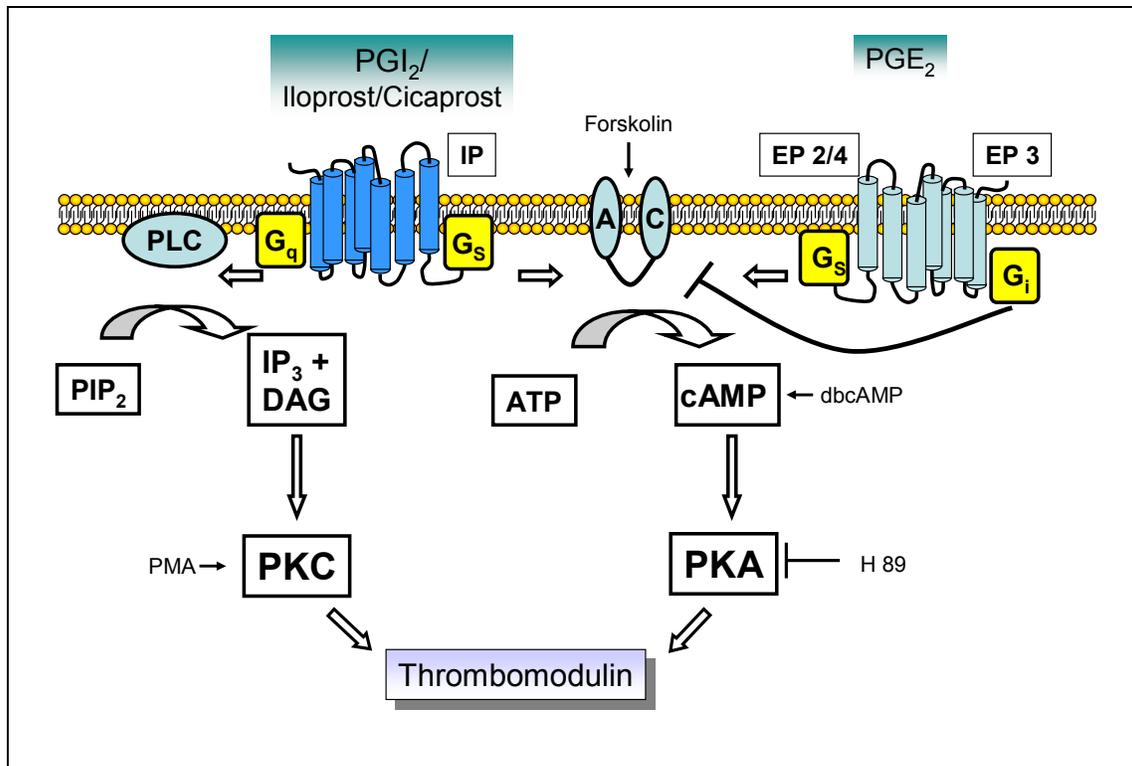


Abbildung 4-1: Prostacyclin- und PGE₂-vermittelte Signaltransduktion zur TM-Induktion in SMC. PGI₂ aktiviert über Bindung an den IP-Rezeptor wie auch PGE₂ über Bindung an den EP_{2/4}-Rezeptor die AC, die ATP zu cAMP umsetzt. cAMP aktiviert die PKA, die daraufhin zu einem Anstieg der TM-Expression führt. Auch die direkte Aktivierung der PKC durch PMA induziert die TM-Expression. Hemmung der AC durch Stimulation des EP₃-Rezeptors reduziert die Expression von TM.

Die TM-Induktion durch Prostaglandine könnte für die Therapie mit Prostacyclin-Analoga klinisch relevant sein, zumal schon gezeigt wurde, dass ein reduzierter TM-Spiegel bei Patienten mit pulmonaler arterieller Hypertonie nach kontinuierlicher Prostacyclin-Infusion wieder erhöht wurde (Sakamaki et al., 2000). Sowohl Iloprost als auch Cicaprost und PGE₂ induzierten die TM-Expression schon bei sehr geringen Konzentrationen, die auch von endogen gebildeten Prostaglandinen erreicht werden. Dies deutet daraufhin, dass endogen gebildete Prostaglandine eine Rolle bei der Regulation von TM spielen. Endogen gebildete Prostaglandine könnten auch für die TM-Expression bei pathologischen Veränderungen des Prostaglandin-Stoffwechsels, wie beispielsweise bei der Atherosklerose, relevant sein.

4.3. Bedeutung endogen gebildeter Prostaglandine für die Thrombomodulin-Expression

Die Aktivität der COX ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Biosynthese von Prostaglandinen und Thromboxan A_2 aus freigesetzter Arachidonsäure. Die ursprüngliche Auffassung, dass die COX-1 für die physiologische und die COX-2 für die pathophysiologische PG-Synthese zuständig sei, ist mittlerweile überholt. Vielmehr wird heute angenommen, dass die COX-2 Prostaglandine *on demand* synthetisiert, und bei Bedarf hochreguliert werden kann. Natürlich ist die Hemmung einer überschießenden Prostaglandin-Bildung bei chronischen Entzündungen und damit die antiphlogistische und analgetische Wirkung von COX-2-Inhibitoren Grundlage dieser wünschenswerten klinischen Effekte. Bei Patienten mit einer schweren Atherosklerose ist im Vergleich zu Gesunden die Prostacyclin-Ausscheidung im Urin - Surrogatparameter der vaskulären Prostacyclin-Synthese - 4,5-fach erhöht. Analoges gilt für die TX-Metaboliten-Ausscheidung, im wesentlichen bestimmt durch die COX-1 abhängige TXA₂-Synthese im Thrombozyten (Belton et al., 2000). Behandlung dieser Patienten mit einem selektiven COX-2 Inhibitor (Nimesulid) reduzierte die PGI₂-Bildung auf etwa Kontrollwerte gesunder Probanden, während keine signifikante Hemmung des TXA₂-Spiegel nachweisbar war (Belton, 2000). Zielparameter der Prostaglandine und des TXA₂ im kardiovaskulären System sind Plättchenfunktion, der Gefäßtonus und die Steuerung von Migration, Proliferation und Sekretion glatter Gefäßmuskelzellen. Die TXA₂-Bildung erfolgt im Wesentlichen über die COX-1-abhängigen Synthesewege im Thrombozyten. Dagegen entstehen über die COX-2 überwiegend PGI₂ und PGE₂, die beide antagonistisch zu TXA₂ auf diese Parameter wirken. Induktion der COX-2 durch physiologische (Scherstress) und pathophysiologische Stimuli (inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren, oxidativer Stress) führt zu einer vermehrten Bildung von PGI₂ und PGE₂ und damit zu potentiell antithrombotischen und antiatherosklerotischen Effekten.

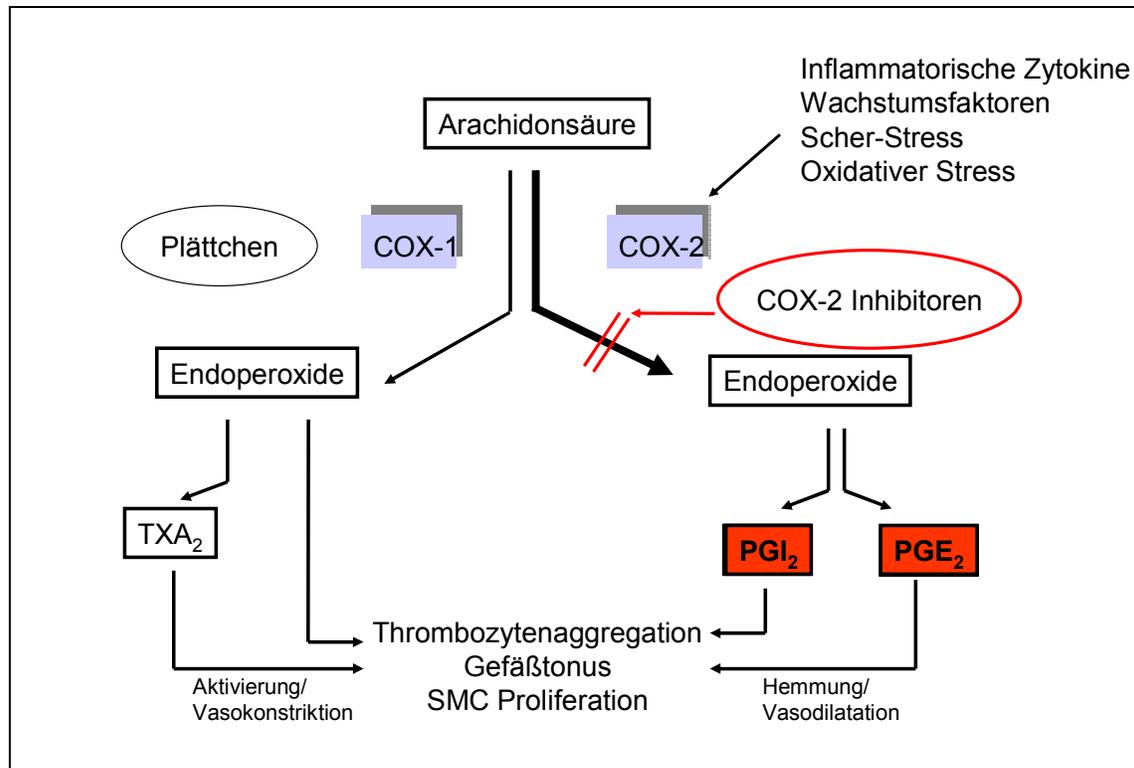


Abbildung 4-2: Arachidonsäuremetabolismus via COX-1 und COX-2 in vaskulären Zellen.

Ein zentraler Punkt dieser Arbeit war daher die Untersuchung der Frage, ob endogen gebildete Prostaglandine über der COX-2-Syntheseweg die TM-Expression induzieren. Theoretisch ist vorstellbar, dass nach Induktion der COX-2, die wie oben erwähnt bei entzündlichen Erkrankungen hochreguliert ist, verstärkt Prostaglandine gebildet werden, die dann wiederum, nach Bindung an spezifische Rezeptoren über einen Anstieg von intrazellulärem cAMP, TM induzieren. Da Zytokine zwar die COX-2 und auch die PGI₂-Synthese induzieren, aber trotzdem zu keiner Aufregulation von TM führen, wurde experimentell in dieser Arbeit PMA zur Imitation einer Entzündung verwendet. Neben der Induktion der COX-2-Protein-Expression durch PMA und Iloprost wurde auch ein funktioneller Nachweis der COX-2-Aktivität erbracht. Mittels Radioimmunoassay (RIA) wurde die Synthese von Prostaglandinen nach Stimulation von SMC und EC mit PMA und Iloprost bestimmt. Als Hauptprodukt der Prostaglandin-Synthese wurde PGI₂ in Form seines stabilen Hydrolyseproduktes 6-Keto PGF_{1α}, identifiziert. PGI₂ wird durch das Enzym PGI₂-Synthase aus PGH₂ gebildet (Narumiya et al., 1999) und ist neben PGE₂ das Hauptprodukt der COX-katalysierten Prostaglandin-Synthese in vaskulären SMC fibrotischer Plaques (Baenziger et al., 1979; Smith, 1986). Stimulation mit PMA führte, bei gleichzeitiger Induktion der COX-2-Protein-Expression in

SMC, nicht nur zu einem Anstieg der PGI₂-Bildung, sondern induzierte auch die TM-Expression. Durch den nicht selektiven COX-Inhibitor Diclofenac und durch den selektiven COX-2 Inhibitor Etoricoxib wurde die PMA-induzierte Aufregulation von TM partiell (zu etwa 40%) inhibiert. Dieser inhibitorische Einfluss der COX-Inhibitoren auf die TM-Expression wurde sowohl auf mRNA- wie auch auf Protein-Ebene gezeigt. Gleichzeitige Analyse der PMA-induzierten PGI₂-Synthese zeigte, dass diese in SMC durch Diclofenac wie auch durch Etoricoxib auf Kontrollniveau gesenkt wurde. Da zwischen dem Ausmaß der Hemmung durch Diclofenac und Etoricoxib keine Unterschiede festgestellt wurden, ist davon auszugehen, dass die COX-2 maßgeblich an dieser PGI₂-Synthese beteiligt war. Trotz vollständiger Hemmung der PMA-induzierten PGI₂-Synthese durch die beiden COX-Inhibitoren wurde die TM-Expression nur zu etwa 40% reduziert. Ursache dafür könnten die sehr vielfältigen Effekte von PMA sein. Über eine Aktivierung der PKC könnte PMA noch weitere Mechanismen aktivieren, die dann wiederum stimulierend auf die TM-Expression wirken. Insgesamt legen diese Ergebnisse nahe, dass die PMA-induzierte TM-Expression zumindest teilweise COX-2-abhängig vermittelt wird. In Kontrollexperimenten wurde kein Effekte der COX-Inhibitoren auf die PMA-induzierte COX-2-Expression festgestellt und damit ein direkter Einfluss der COX-2-Expression ausgeschlossen. Der stimulierende Effekt des PKC-Aktivators, PMA, auf die COX-2 in SMC könnte die Situation von inflammatorischen Prozessen z.B. bei atherosklerotischen Veränderungen oder einer vaskulärer Zellschädigung widerspiegeln. Dort wirken eine Vielzahl an Stimuli, wie proinflammatorische Zytokine, TNF- α und Wachstumsfaktoren auf die glatten Gefäßmuskelzellen ein (Ross, 1999), die eine gesteigerte COX-2-Expression induzieren können (Bishop-Bailey et al., 1998). Bestätigt wird diese Hypothese durch verschiedene Arbeiten: So wurde in humanen atherosklerotischen Läsionen eine erhöhte COX-2-Expression nachgewiesen, während gesunde Gefäße nur die COX-1 Isoform exprimierten (Schönbeck et al., 1999). Zudem konnte nach einer Gefäßverletzung eine gesteigerte COX-2 Expression über mehrere Tage nachgewiesen werden (Rimarachin, 1994). Insgesamt kann gesagt werden, dass endogene Prostaglandine, gebildet über den COX-2-Syntheseweg, die TM-Expression induzieren können. Damit könnten endogen gebildete Prostaglandine zu einer verstärkten TM-abhängigen Aktivierung von PC führen und damit dessen antikoagulatorische Aktivität erhöhen. TM-Plasmaspiegel können auch als Marker für pathologisch veränderte Zustände dienen: Patienten mit einer pulmonalen arteriellen Hypertonie zeigten beispielsweise eine reduzierte TM- und eine erhöhte P-Selektin-Plasmakonzentration. Kontinuierliche

intravenöse Prostacyclin-Therapie führte zu einer signifikanten Induktion des TM-Spiegels, wie auch zu einer Reduktion des Plasma P-Selektin-Spiegels (Sakamaki et al., 2000). Da niedrige TM- und hohe P-Selektin-Plasmaspiegel in der primären und sekundären pulmonalen Hypertonie mit einem erhöhten Thromboserisiko assoziiert werden, zeigt diese Studie, dass PGI₂ nicht nur ein potenter Vasodilatator ist und der Thrombozytenaggregation entgegenwirkt, sondern möglicherweise auch einen Einfluss auf die plasmatische Koagulation über eine Modulation von TM hat. Auch die in der Einleitung beschriebenen antiinflammatorischen Wirkungen von aPC und TM könnten Entzündungsprozessen entgegenwirken (Esmon, 2002). Diese Überlegungen sprechen daher für eine antithrombotische und anti-atherosklerotische Wirkung von COX-2-abhängig gebildetem PGI₂ und PGE₂. Allerdings wird die Frage ob COX-2-Inhibitoren vor- oder nachteilige Effekte bei der Entwicklung einer Atherosklerose haben, in der Literatur dennoch kontrovers diskutiert. So konnte eine Arbeit von Chenevard et al. (Chenevard et al., 2003) zeigen, dass Inhibierung der COX-2 die endotheliale Vasodilatation verbessert und auch geringfügige chronische Entzündungen und oxidativen Stress reduziert. Außerdem konnten Burleigh et al. zeigen, dass die COX-2 die Entstehung von atherosklerotischen Läsionen in LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen *in vivo* fördert. Dies würde bedeuten, dass die Hemmung der COX-2 einen antiatherosklerotischen Effekt haben könnte (Burleigh et al., 2002). Zwei weitere Studien konnten allerdings keinen Einfluss einer pharmakologischen COX-2-Inhibition in LDL-Rezeptor- oder Apolipoprotein (APO)-E-defizienten Mäusen feststellen (Pratico et al., 2001; Olesen et al., 2002).

4.4. Funktionelle Bedeutung einer erhöhten Thrombomodulin-Expression

Die funktionellen Auswirkungen einer erhöhten TM-Expression für die plasmatische Koagulation wurden sowohl zur Methodenetablierung an humanen koronararteriellen EC, einem Zellsystem mit hoher TM-Expression, als auch an SMC untersucht. Dazu wurden zwei unterschiedliche methodische Ansätze verfolgt. Zunächst wurde die zellabhängige Thrombinbildung untersucht. Thrombin, an TM gebunden, aktiviert PC, welches dann die Koagulationsfaktoren Va und VIIIa inaktiviert und damit die Thrombinbildung effizient reduziert (Esmon, 2000). Spaltung eines fluorogenen Substrats ermöglicht die Messung der Thrombin-Konzentration in gerinnendem Plasma und damit die Analyse des Zeitverlaufs der

Thrombinbildung. Hierzu wurde die von Hemker et al. (Hemker et al., 2000) entwickelte Methode dahingehend modifiziert, dass als TF-Quelle kultivierte Zellen verwendet wurden, was die simultane Erfassung von stimulierenden (z.B. TF) und inhibierenden Faktoren (z.B. die TM-abhängige Protein C Aktivierung) ermöglicht. Anders als erwartet war die PMA-induzierte zellabhängige Thrombinbildung in EC trotz erhöhter TM-Expression deutlich erhöht. Eine mögliche Ursache für das scheinbar widersprüchliche Resultat könnte die gleichzeitig beobachtete Induktion von prokoagulatorisch wirkendem TF durch PMA sein. Diese erhöhte TF-Expression könnte die antikoagulatorischen Effekte des TM überlagern oder sogar aufheben. Die Untersuchung der Thrombinbildung auf der Oberfläche humaner SMC zeigte auch keinen reduzierenden Einfluss der erhöhten TM-Expression auf die Thrombinbildung. Auch hier könnte die Ursache der fehlenden Wirkung von TM in der TF-Expression liegen. Während auf EC basal so gut wie keine TF-Expression festzustellen ist, diese jedoch induzierbar (wie z.B. durch PMA) ist (Crossman et al., 1990), zeigen SMC eine hohe basale TF-Expression (Ghrib et al., 2002; Kibbe et al., 2003), die dem antikoagulatorischen Effekt des TM entgegenwirken könnte. Es wurde beschrieben, dass der Zusatz von aPC und rekombinantem TM einen hemmenden Effekt auf die Thrombinbildung in der von Hemker entwickelten Methode hat (Hemker et al., 2003). Diese Daten zeigen, dass mittels dieser Methode die Möglichkeit besteht, eine Dysfunktion im antikoagulatorischen PC-System, wie z.B. angeborene oder erworbene PC-Resistenz bzw. -Defizienz, zu erkennen. Der Zusatz von aPC zu dem hier modifizierten System reduzierte ebenfalls die Thrombinbildung signifikant. Damit konnte die inhibitorische Wirkung von aPC auf die Thrombinbildung auch in dem hier verwendeten System bestätigt werden. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass entweder kein funktionell aktives TM auf der Zelloberfläche vorhanden ist, oder dass andere prokoagulatorische Mechanismen (z.B. TF) den antithrombotischen Effekt von TM überlagern.

Daher wurde eine andere Methode zur Überprüfung der funktionellen Aktivität von TM auf der Oberfläche glatter Gefäßmuskelzellen herangezogen, d. h. die Messung der Protein C-Aktivierung. CASMC und EC wurden mit verschiedenen Substanzen stimuliert. Anschließend wurden diese mit einem Thrombin und PC enthaltenen Puffer beschichtet. Dieser Puffer wurde nach Ende der Inkubationszeit zu gleichen Teilen eines Hirudin enthaltenen Puffers gegeben, um die restliche Thrombin-Aktivität zu inhibieren. Es ist bekannt, dass auch Thrombin allein Protein C aktivieren kann (Esmon, 1993; Hall et al., 1999). Daher wurde zusätzlich bei jedem Experiment eine Probe der Protein C/Thrombin-Lösung ohne Zellen

inkubiert, um den Basalwert der Thrombin-katalysierten PC-Aktivierung festzustellen. So konnte exakt zwischen der TM/Thrombin-katalysierten PC-Aktivierung und der Aktivierung durch Thrombin allein unterschieden werden. Bei gleichzeitig beobachteter TM-Induktion erhöhte Iloprost auch die Bildung des antikoagulatorisch wirkenden aPC. Damit wurde erstmalig ein antikoagulatorischer Mechanismus, neben der Hemmung der Plättchenaggregation, von Iloprost auf die plasmatische Koagulation beschrieben. Auch PMA führte zu einem signifikanten Anstieg von aPC. Eine PC-Aktivierung durch den Thrombin-TM-Komplex und die Aktivierung durch Thrombin allein sind die einzigen in der Literatur beschriebenen Mechanismen der PC-Aktivierung. Daher kann der Schluss gezogen werden, dass die PMA-induzierte TM-Expression für die gesteigerte Aktivierung von PC verantwortlich ist. Reduktion der PMA-induzierten TM-Expression durch die COX-Inhibitoren Diclofenac und Etoricoxib wirkte sich ebenfalls hemmend auf die PC-Aktivierung aus. Dies zeigt, dass endogen gebildete Prostaglandine über eine Induktion von funktionell aktivem TM die plasmatische Koagulation beeinflussen. Da auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen dem inhibitorischen Effekt des unselektiven COX-Inhibitors Diclofenac und des selektiven COX-2-Inhibitors Etoricoxib nachgewiesen werden konnten, ist davon auszugehen, dass maßgeblich die COX-2-abhängig gebildeten Prostaglandine an der Vermittlung der PC-Aktivierung beteiligt sind.

4.5. Thrombomodulin- und COX-2-Expression in humanen Atherektomieproben

Die TM-Expression glatter Gefäßmuskelzellen wurde *in vivo* erst kürzlich dokumentiert (Yoshii et al., 2003). In gesunden humanen Koronararterien ist TM nur auf Endothelzellen nachweisbar, während bei Atherosklerose TM in SMC der Intima und Media der Gefäßwand nachgewiesen wurden (Tohda et al., 1998; Yoshii et al., 2003). Um die mögliche Signifikanz dieser Ergebnisse für die Pathophysiologie der Atherosklerose zu überprüfen, wurden Schnitte von atherosklerotischen Läsionen angefertigt und immunhistochemisch die Expression von TM, COX-2 und SMC untersucht. Immunhistochemische Untersuchungen an humanem Gewebe, welches bei einer Atherektomie aus der Arteria carotis entnommen wurde bestätigte die TM-Expression in SMC atherosklerotischer Läsionen. SMC zeigten eine positive Färbung für COX-2 in den Bereichen, in denen auch TM nachweisbar war. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass über den COX-2-Syntheseweg endogen gebildete Prostaglandine in einer

autokrinen oder parakrinen Weise die TM-Expression stimulieren. Welche Funktion die Expression von TM auf SMC hat, ist bislang noch unbekannt. Vorstellbar wäre, dass bei endothelialer Verletzung SMC mit dem zirkulierenden Blut in Kontakt kommen und durch Expression von TM ein Gegengewicht zu den prokoagulatorischen Faktoren geschaffen wird. Außerdem ist bekannt, dass EC-Spaltprodukte des TM, so genanntes lösliches TM (sTM), in das zirkulierende Blut abgegeben wird (Esmon, 2001a). Induktion der TM-Expression (z.B. durch dbcAMP) erhöht nicht notwendigerweise auch die Konzentration an sTM. Induziert wird diese jedoch nach Destruktion von EC (Ishii et al., 1991). Ein Hinweis darauf, dass auch SMC sTM abspalten, ergab die Untersuchung des Kulturmediums, welche zwar einen tendenziellen, jedoch keinen signifikanten Anstieg des TM-Spaltproduktes gegenüber der Kontrolle ergab (Daten nicht gezeigt). TM besitzt auch antiinflammatorische, antimigratorische und antiproliferative Wirkungen (Grinnell und Berg, 1996a; Li et al., 2000; Esmon, 2001b). Dies könnte einen alternativen Mechanismus darstellen, über den das von SMC exprimierte oder sezernierte TM der Atherosklerose entgegenwirkt. Generell kann gesagt werden, dass bei fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen die Gefahr der Bildung eines Thrombus steigt (Feldman und Stone, 2000). Die Expression von TM auf SMC in atherosklerotischen Läsionen könnte die Thrombosegefahr mindern, indem es die prokoagulatorische Disposition reduziert. Die Ausbildung einer Atherosklerose ist mit einem *Remodeling* assoziiert, bei dem sich SMC vom physiologischen kontraktilen zu einem proliferierenden, sekretorischen Phänotyp umwandeln. Interessanterweise gibt es Arbeiten, die darauf hindeuten, dass die TM-Expression von intrazellulären Faktoren kontrolliert wird, die auch mit der Modulation von SMC des kontraktilen Phänotyps zum synthetischen Phänotyp assoziiert werden (Chamley-Campbell et al., 1979; Traynor et al., 1995). Die TM-Expression korreliert hauptsächlich mit SMC des synthetischen Phänotyps (Yoshii et al., 2003). Da außerdem die endotheliale Expression von TM in atherosklerotisch veränderten Koronararterien reduziert ist (Laszik et al., 2001), könnten SMC unter diesen pathologischen Bedingungen eine relevante TM-Quelle darstellen.

4.6. Bedeutung von Thrombomodulin für die Therapie mit COX-2-Inhibitoren

Die Blutgerinnung ist reguliert durch ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlichster Enzyme, deren Kofaktoren und verschiedenen Membranproteinen. Dabei ist das Gleichgewicht zwischen prokoagulatorischen und antikoagulatorischen Mechanismen essentiell für das hämostatische Gleichgewicht. Eine Aktivierung der im Blut zirkulierenden Zymogene stellt die Basis für eine explosionsartige Initiierung der Blutgerinnung dar, welche zur Bildung von Thromben führt. Die Konzentration an zirkulierendem Prothrombin ist ca. 100-fach höher, als für die schnelle Bildung von Blutgerinnseln eigentlich benötigt wird (Mann et al., 1988). Dies stellt die Basis für eine massive Thrombusbildung im Falle einer Gefäßschädigung dar. Bei gesunden Personen ist das Koagulationssystem sehr effizient kontrolliert und das Gleichgewicht liegt auf der Seite der antikoagulatorischen Mechanismen (Bauer und Rosenberg, 1987). Bei verschiedenen Krankheiten, insbesondere solchen, die mit entzündlichen Prozessen einhergehen, ist die Neigung zu thrombotischen Ereignissen jedoch stark erhöht (Esmon, 1989). Dies impliziert, dass bei diesen Personen die antikoagulatorischen Mechanismen reduziert sind. Diese Hypothese wird von der Beobachtung unterstützt, dass eine angeborene PC-Defizienz schon in der Kindheit zu teilweise tödlich verlaufenden thrombotischen Komplikationen führt (Moncada et al., 1976). Neben dem NO, verantwortlich für die Inhibierung der Plättchen, und der Vasokonstriktion (Moncada et al., 1988), *plasminogen activator*, der die Lyse von Thromben initiiert (Loskutoff et al., 1986) und Heparansulfat-haltigen Proteoglykanen, die die Aktivität von Antithrombin verstärken (Bauer und Rosenberg, 1987), sind PGI₂ (Vane und Botting, 1995) und das Thrombin-bindende Protein TM (Esmon und Owen, 1981) maßgeblich an der Regulation antikoagulatorischer Mechanismen beteiligt. Die embryonale Letalität von TM-defizienten Mäusen verdeutlicht außerdem die essentielle Rolle von TM (Healy et al., 1995). Die lokale Überexpression von TM verhindert eine Atherothrombose im Kaninchenmodell (Waugh et al., 1999). Auch die reduzierte Resistenz gegen thrombotische Verschlüsse bei venösen Bypässen ist mit einer Reduktion der TM-Expression assoziiert (Kim et al., 2002). Klinische Studien zeigen, dass die Konzentration von löslichem TM invers mit dem Risiko einer koronaren Herzkrankheit (KHK) assoziiert ist (Salomaa et al., 1999; Wu et al., 2003). Die Ergebnisse der *Atherosclerosis Risk In Communities* (ARIC)-Studie deuteten darauf hin, dass die Konzentrationen von löslichem *intercellular adhesive molecule-1* (sICAM) und sTM mit dem Risiko der Entwicklung einer KHK assoziiert sind. Ein hoher sICAM-1-Spiegel erhöht

das Risiko einer KHK, während eine hohe Konzentration von sTM das Risiko verringert (Folsom et al., 1997; Wu et al., 2003). Daher spielt die Regulation von TM sowohl in EC wie auch in SMC eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der hämostatischen Balance von pro- und antikoagulatorischen Mechanismen. Für die Therapie verschiedener entzündlicher Erkrankungen ist der Einsatz von COX-Inhibitoren heute zum Erreichen einer adäquaten Analgesie, unverzichtbar. Acetylsalicylsäure (ASS) und andere NSAID inhibieren die COX-abhängige PGI₂-Synthese. Dies ist der Mechanismus sowohl für die therapeutischen, als auch einige toxische Effekte der Substanz. In der Klasse der nicht steroidalen Antirheumatika (NSAID) sind die Coxibe eine Untergruppe, die entwickelt wurde, um selektiv die COX-2 zu inhibieren. Grundlage dieser Entwicklung war die Annahme, dass COX-2 Quelle von proinflammatorischem Prostaglandin E₂ ist, das bei entzündlichen Ereignissen gebildet wird und das von der COX-1 im Magen gebildete PGE₂ und PGI₂ für die Protektion des Magens verantwortlich sind. Daher hemmen Coxibe weit stärker die Entzündungssymptome und verursachen daher seltener gastrointestinale Ulcera. Nichtselektive NSAID hemmen sowohl die Thromboxan A₂-Synthese, wie auch die PGI₂-Synthese. Selektive COX-2-Inhibitoren haben dagegen keinen Effekt auf die Thromboxan A₂-Bildung, reduzieren jedoch die PGI₂-Synthese. Auf diese Art verschieben Coxibe das Gleichgewicht zwischen prothrombotischem TXA₂ und antithrombotischem PGI₂ und führen so möglicherweise zu einem Anstieg thrombotischer kardiovaskulärer Ereignisse (McAdam et al., 1999; Catella-Lawson et al., 1999). Die klinische Relevanz dieser Mechanismen ergibt sich aus der erhöhten Inzidenz akuter thromboembolischer Gefäßverschlüsse bei Patienten mit rheumatoider Arthritis im Gegensatz zu Patienten mit Osteoarthritis, bei denen ein solches erhöhtes Risiko nicht besteht (Wallberg-Jonsson et al., 1997). Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis ist das Risiko akuter thrombotischer Ereignisse auf der Grundlage retrospektiver epidemiologischer Studien um 32-55 % höher als bei Patienten mit Osteoarthritis oder einer gemischten Kontrollpopulation (FitzGerald, 2002). Für die hier diskutierte Thematik stellt sich damit die Frage, ob die Anwendung von selektiven COX-2 Inhibitoren mit einem erhöhten Risiko kardiovaskulärer thrombotischer Ereignisse verbunden ist. Theoretisch ist vorstellbar, dass bei Patienten mit rheumatoider Arthritis ein erhöhtes Risiko auf der oben beschriebenen Hemmung der COX-2 abhängigen PGI₂-Synthese beruht. Durch Hemmung der PGI₂-Synthese könnte, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, nicht nur ein potenter Inhibitor der Plättchenaggregation ausgeschaltet, sondern auch die TM-Expression und die PC-Aktivierung unterdrückt und damit ein endogener antikoagulatorischer Mechanismus inhibiert werden. Alternativ könnte

die fehlende COX-1-Hemmung und damit die fehlende Unterdrückung der thrombozytären TXA₂-Synthese zu diesem erhöhten Risiko führen.

Ein potentiell erhöhtes kardiovaskuläres Risiko von COX-2-Inhibitoren rückte erst kürzlich wieder in das Interesse der Öffentlichkeit. Am 28 September 2004 gab der Pharmakonzern MSD die Rücknahme des COX-2-Inhibitors Rofecoxib (Vioxx®) bekannt, da sich in der vorzeitig abgebrochenen *Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx* (APPROVe)-Studie eine Zunahme von Herzinfarkten gezeigt hatte (Topol, 2004). In diesem Zusammenhang muss die Frage gestellt werden, ob dies auch auf andere Coxibe wie Valdecoxib, Celecoxib, Etoricoxib und Lumiracoxib übertragbar ist und damit ein Klasseneffekt der Coxibe ist. In den letzten Monaten und Jahren sind zahlreiche epidemiologische Studien erschienen, die das Risiko von Blutdrucksteigerungen, Ödemen, Herzinsuffizienz und Myokardinfarkten unter Rofecoxib und herkömmlichen NSAID verglichen haben. So hat eine Studie von Solomon et al. an über 54.000 Patienten zeigen können, dass Celecoxib das Risiko eines Myokardinfarktes nicht signifikant erhöht. Rofecoxib dagegen, im Vergleich zu Celecoxib und anderen NSAID, in den ersten 90 Tagen zu einem erhöhten Risiko eines akuten Myokardinfarktes führt. Das relative Risiko war ebenfalls erhöht bei einem Dosis-abhängigen Vergleich (Rofecoxib ≤ 25 mg versus Celecoxib ≤ 200 mg (odds ratio (OR), 1.21; 95% CI, 1.01 - 1.44; P = 0.036) und Rofecoxib > 25 mg versus Celecoxib > 200 mg (OR, 1.70; 95% CI, 1.07 - 2.71; P = 0.026) (Solomon et al., 2004). Aus Daten, die im Zusammenhang mit der *Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research* (VIGOR)-Studie erhoben wurden, ließ sich bereits im Jahre 2000 ein erhöhtes Risiko kardiovaskulärer Ereignisse erkennen. Auch wenn kardiovaskuläre Ereignisse nicht als Endpunkt der VIGOR-Studie definiert waren (Bombardier et al., 2000), wurde eine Zunahme in vorläufigen Analysen registriert. Bei dem Vergleich der beiden Behandlungsgruppen konnte eine signifikante Zunahme atherothrombotischer Ereignisse gezeigt werden 0,4 % der Patienten der Rofecoxib-Gruppe, aber nur 0,1 % der Patienten der Naproxen-Gruppe erlitten einen Herzinfarkt. Hinzu kommt, dass dieses Risiko bei Patienten mit bestehender KHK möglicherweise höher ist, 38 % der Herzinfarkte traten in einem Patientenkollektiv auf, das vermutlich ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko hatte. Die Einnahme von ASS war, wie auch frühere atherothrombotische Ereignisse einschließlich Herzinfarkt, ein Ausschlusskriterium (erstgenanntes wurde später aufgrund der Ergebnisse aufgehoben). Die Argumentation, dass Naproxen, welches als Vergleich für Rofecoxib dient, aufgrund seines COX-1-hemmenden Effektes und der langen Halbwertszeit (13 h) die

Thrombozytenfunktion hemmt und damit protektiv wirkt, reicht zur Erklärung der Differenz in der VIGOR-Studie nicht aus. Im Gegensatz zur irreversibel wirkenden ASS konnte bislang nicht gezeigt werden, dass NSAID, inklusive Naproxen, eine kardioprotektive Wirkung haben (FitzGerald, 2003b). Im Gegensatz zur VIGOR-Studie zeigte die *Celecoxib Long Term Arthritis Safety Study* (CLASS)–Studie kein signifikant erhöhtes kardiovaskuläres Risiko des selektiven COX-2-Inhibitors (Celecoxib) versus NSAID (Bombardier et al., 2000; Silverstein et al., 2000). Diese Studie beinhaltete jedoch nur die Hälfte der Daten (nur sechs Monate einer einjährigen Studie) (FitzGerald, 2004). Eine retrospektive Analyse der Daten zeigte, dass nach einem Jahr die Einnahme von Celecoxib sich nicht von den NSAID hinsichtlich der Magentoxizität unterschied, jedoch Anzeichen eines erhöhten kardiovaskulären Risikos festzustellen waren (FitzGerald, 2003a). Die Tatsache, dass niedrigdosierte ASS in der CLASS-Studie erlaubt war, könnte ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko im Zusammenhang mit Celecoxib verdeckt haben. Außerdem wurden in den beiden Studien unterschiedliche NSAID als Kontrollen verwendet. Diclofenac und Ibuprofen, die in der CLASS-Studie verwendet wurden, zeigen einen signifikant geringeren Plättchen-inhibierenden Effekt verglichen mit Naproxen (VIGOR). Um einen protektiven vaskulären Effekt zu erreichen, ist eine nahezu komplette Inhibierung der TXA₂-Synthese erforderlich (O'Reilly et al., 2000) und das Ausmaß sowie die Reversibilität der TXA₂-Inhibition durch Diclofenac und Ibuprofen erlaubten wahrscheinlich keine Kardioprotektion. Außerdem wurde beschrieben, dass Diclofenac im Vergleich zu Naproxen die Prostacyclin-Synthese stärker inhibiert (Van Hecken et al., 2000). Hinzu kommt, dass Celecoxib von allen derzeit verfügbaren Coxiben, die mit Abstand geringste COX-2-Selektivität und Bioverfügbarkeit aufweist. Die erst kürzlich erschienene *Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial* (TARGET)–Studie verglich Lumiracoxib mit Naproxen und Ibuprofen. Der primäre Endpunkt war das Auftreten ernsthafter gastrointestinaler Komplikationen, welche bei Patienten, die den COX-2-Inhibitor erhielten, signifikant reduziert waren (Farkouh et al., 2004). Obwohl die Studie wie auch die CLASS-Studie nicht auf die Detektion von kardiovaskulären Ereignissen ausgelegt war, konnte in der Gruppe, die kein ASS einnahm, ein (nicht signifikanter) Trend zu einem Anstieg dieser Ereignisse in der Lumiracoxib-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden (0,26 versus 0,18 pro 100 Patientenjahre; relatives Risiko: 1,47). Allerdings waren Patienten mit einem hohen Risiko für Magen Darm-Ulcera oder mit koronarer Herzkrankheit ausgeschlossen. Parecoxib, die inaktive Vorstufe von Valdecoxib, zeigte bei Patienten mit koronarer Bypassoperation erhöhte kardiovaskuläre Risiken. Die

Zulassung dieses Wirkstoffes wurde von der FDA nicht genehmigt (FitzGerald, 2004). Ein potentiell erhöhtes Thromboserisiko der COX-2-Inhibitoren wird auch von einigen experimentellen Arbeiten unterstützt. Shinmura et al. (Shinmura et al., 2000) zeigten, dass COX-2 die kardioprotektiven Effekte in der späten Phase der ischämischen Präkonditionierung vermittelt sind, wie die Fähigkeit der Myozyten, eine Ischämie zu überleben. Ebenso konnte gezeigt werden, dass Celecoxib die ASS-abhängige Verzögerung eines thrombotischen Gefäßverschlusses in einem koronaren Thrombose-Modell beim Hund verhindert (Hennan et al., 2001). Auch die Doxorubicin-vermittelte Myozytotoxizität wurde durch COX-2-Inhibitoren verstärkt, was insgesamt darauf hindeutet, dass COX-2 protektive Effekte auf das Herz hat (Dowd et al., 2001). Koronarsklerose mit thrombotischen Verschlüssen ist eine der Hauptgründe für einen akuten Myokardinfarkt. Obwohl die Ruptur einer Plaque meist als Prädisposition für eine koronare Thrombose angesehen wird, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch lokale Veränderungen in den antikoagulatorischen Eigenschaften dazu beitragen. Die reduzierte Expression von TM und des endothelialen Protein C-Rezeptors, welche mit einer Koronarsklerose assoziiert wurde (Laszik et al., 2001), könnte eine solche Prädisposition darstellen. Eine zusätzliche Reduktion von TM durch Hemmung der COX-2-abhängigen Prostaglandin-Synthese könnte das kardiovaskuläre Risiko zusätzlich erhöhen. Selektive Reduktion der PGI₂-Synthese führt damit nicht nur zu einer fehlenden Hemmung der Thrombozytenaggregation, sondern reduziert über eine verminderte TM-Expression auch die Aktivierung des antikoagulatorisch wirkenden PC. Ist dies das Resultat einer selektiven COX-2-Inhibition, muss zwangsläufig ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko mit allen Wirkstoffen dieser Klasse assoziiert werden, welches dann mit aszendenter Selektivität und Halbwertszeit ansteigen müsste. Dies würde bedeuten, dass das intrinsische Risiko eines akuten, thromboembolischen Gefäßverschlusses eines Patienten und dessen Manifestation durch Einnahme von COX-2-selektiven Inhibitoren erhöht wird.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Atherosklerose und ihre Komplikationen sind für ca. 50% der Todesfälle in Europa, USA und Japan verantwortlich. Heute zählt die Atherosklerose zu den chronisch entzündlichen Erkrankungen. Ursächlich an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt ist eine Funktionsstörung des Endothels, die zu thrombotischen Verschlüssen arterieller Gefäße führen kann. Als endogener Schutzmechanismus wird die Induktion der COX-2 und die Bildung von Prostacyclin in glatten Gefäßmuskelzellen (SMC) atherosklerotischer Gefäße angesehen. Die gesteigerte Bildung von PGI₂ und PGE₂ in SMC führt beispielsweise zu einer Hemmung der Proliferation und Migration von SMC und Hemmung der Thrombozytenaggregation. Es ist bislang noch nicht systematisch untersucht worden, ob Prostaglandine Thrombozyten-unabhängig die Blutgerinnung beeinflussen. Denkbar wäre jedoch eine Interaktion mit der plasmatischen Koagulation durch eine PGI₂-induzierte TM-Expression. Folgende Fragestellungen waren daher Gegenstand dieser Arbeit: 1. Wird TM in humanen arteriellen SMC durch exogene Prostaglandine beeinflusst? 2. Welche Rezeptoren sind an dieser Regulation beteiligt und welche Signaltransduktionewege sind involviert? 3. Wird TM von endogen COX-1/COX-2-abhängig gebildeten Prostaglandinen reguliert? 4. Hat die TM-Expression von SMC eine funktionelle Bedeutung (z.B. PC-Aktivierung)? 5. Welche Bedeutung könnten diese Befunde für das erhöhte Thromboserisiko bei einer Atherosklerose haben?

Iloprost induzierte zeit- und konzentrationsabhängig die Expression von Thrombomodulin. Mechanistisch wurde gezeigt, dass Stimulation von G_s-gekoppelten Prostaglandin-Rezeptoren (IP-, EP_{2,4}), über eine Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration zu einer Aufregulation von TM führt. Die Aktivierung der G_i-gekoppelten EP₃-Rezeptoren reduziert dagegen über eine Verminderung der intrazellulären cAMP-Konzentration die TM-Expression. Die zentrale Rolle von cAMP bei der TM-Regulation konnte durch Induktion der TM-Expression mit Forskolin und dbcAMP bestätigt werden. Die Reduzierung der TM-Expression durch Inhibition der PKA legte zusätzlich die Involvierung des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges nahe. Iloprost führte über die Thrombomodulin-Induktion zu einer erhöhten Protein C-Aktivierung. Damit konnte erstmals ein inhibitorischer Mechanismus von Iloprost auf die plasmatische Gerinnung beschrieben werden. Die Relevanz endogener, COX-2-abhängig gebildeter Prostaglandine für die Regulation von TM wurde durch die partielle Hemmung der PMA-induzierten TM-Expression mit Etoricoxib und Diclofenac gezeigt. COX-2-abhängig gebildetes PGI₂/PGE₂ führte ebenso zu einer Induktion der Protein C Aktivierung. Damit kommt der Induktion von Thrombomodulin durch endogene Prostaglandine eine bedeutende Rolle für die Aktivierung von Protein C zu. Das Ausmaß der Hemmung durch den unselektiven COX-Inhibitor Diclofenac und des selektiven COX-2-Inhibitors Etoricoxib unterschied sich nicht signifikant. Dies zeigt, dass maßgeblich COX-2 und nicht COX-1 an dieser Regulation beteiligt ist. Die Relevanz dieser Befunde *in vivo* wurde durch die Kolo-kalisation von TM und COX-2 in SMC humaner atherosklerotischer Läsionen belegt. Die Hemmung des antikoagulatorisch wirkenden Thrombomodulin/Protein C Signalweges durch den COX-2-Inhibitor Etoricoxib stellt einen weiteren Prostaglandin-abhängigen Mechanismus dar, der zu erhöhten kardiovaskulären Nebenwirkungen dieser Pharmaka beitragen könnte.

Bei inflammatorischen Erkrankungen wie der Atherosklerose kommt den hier dargestellten Ergebnissen eine besondere Bedeutung zu. Hemmung der vaskulären Prostacyclin-Synthese durch selektive COX-2-Inhibitoren bei gleichzeitig unveränderten Thromboxan-A₂-Spiegeln würde klinisch einem erhöhten Thromboserisiko entsprechen, zum einen über die fehlende Inhibierung der Plättchenaggregation und zum anderen über die Reduktion von antikoagulatorisch wirkendem aktivierten Protein C.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Alban S, Welzel D, Hemker HC (2002), Pharmacokinetic and pharmacodynamic characterization of a medium-molecular-weight heparin in comparison with UFH and LMWH. *Semin Thromb Hemost* 28:369-378

Archipoff G, Beretz A, Bartha K, Brisson C, de-la-Salle C, Froget-Leon C, Klein-Soyer C, Cazenave JP (1993), Role of cyclic AMP in promoting the thromboresistance of human endothelial cells by enhancing thrombomodulin and decreasing tissue factor activities. *Br J Pharmacol* 109:18-28

Archipoff G, Beretz A, Freyssinet JM, Klein-Soyer C, Brisson C, Cazenave JP (1991), Heterogeneous regulation of constitutive thrombomodulin or inducible tissue-factor activities on the surface of human saphenous-vein endothelial cells in culture following stimulation by interleukin-1, tumour necrosis factor, thrombin or phorbol ester. *Biochem J* 273:679-684

Armstrong RA (1996), Platelet prostanoid receptors. *Pharmacol Ther* 72:171-191

Baenziger NL, Becherer PR, Majerus PW (1979), Characterization of prostacyclin synthesis in cultured human arterial smooth muscle cells, venous endothelial cells and skin fibroblasts. *Cell* 16:967-974

Bajzar L, Morser J, Nesheim M (1996), TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex. *J Biol Chem* 271:16603-16608

Bajzar L, Nesheim M, Morser J, Tracy PB (1998), Both cellular and soluble forms of thrombomodulin inhibit fibrinolysis by potentiating the activation of thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* 273:2792-2798

Bauer KA, Rosenberg RD (1987), The pathophysiology of the prethrombotic state in humans: insights gained from studies using markers of hemostatic system activation. *Blood* 70:343-350

Beasley D (1997), Phorbol ester and interleukin-1 induce interleukin-6 gene expression in vascular smooth muscle cells via independent pathways. *J Cardiovasc Pharmacol* 29:323-330

Belton O (2000), Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation* 102:840-845

Belton O, Byrne D, Kearney D, Leahy A, Fitzgerald DJ (2000), Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation* 102:840-845

Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ, Jr. (2001), Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 344:699-709

Bishop-Bailey D, Pepper JR, Larkin SW, Mitchell JA (1998), Differential induction of cyclooxygenase-2 in human arterial and venous smooth muscle: role of endogenous prostanoids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1655-1661

- Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, Day R, Ferraz MB, Hawkey CJ, Hochberg MC, Kvien TK, Schnitzer TJ (2000), Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med* 343:1520-8, 2
- Bourin MC, Lindahl U (1990), Functional role of the polysaccharide component of rabbit thrombomodulin proteoglycan. Effects on inactivation of thrombin by antithrombin, cleavage of fibrinogen by thrombin and thrombin-catalysed activation of factor V. *Biochem J* 270:419-425
- Bourin MC, Lundgren-Akerlund E, Lindahl U (1990), Isolation and characterization of the glycosaminoglycan component of rabbit thrombomodulin proteoglycan. *J Biol Chem* 265:15424-15431
- Bourin MC, Ohlin AK, Lane DA, Stenflo J, Lindahl U (1988), Relationship between anticoagulant activities and polyanionic properties of rabbit thrombomodulin. *J Biol Chem* 263:8044-8052
- Bradbury DA (2002), Effect of bradykinin, TGF-beta1, IL-1beta, and hypoxia on COX-2 expression in pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:
- Bretschneider E, Wittpoth M, Weber AA, Glusa E, Schrör K (1997), Thrombin but not thrombin receptor activating peptide is mitogenic for coronary artery smooth muscle cells. *Thromb Res* 87:493-497
- Broekmans AW, Veltkamp JJ, Bertina RM (1983), Congenital protein C deficiency and venous thromboembolism. A study of three Dutch families. *N Engl J Med* 309:340-344
- Broze GJ, Jr., Warren LA, Novotny WF, Higuchi DA, Girard JJ, Miletich JP (1988), The lipoprotein-associated coagulation inhibitor that inhibits the factor VII-tissue factor complex also inhibits factor Xa: insight into its possible mechanism of action. *Blood* 71:335-343
- Burleigh ME, Babaev VR, Oates JA, Harris RC, Gautam S, Riendeau D, Marnett LJ, Morrow JD, Fazio S, Linton MF (2002), Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice. *Circulation* 105:1816-1823
- Butenas S, Branda RF, van't Veer C, Cawthorn KM, Mann KG (2001), Platelets and phospholipids in tissue factor-initiated thrombin generation. *Thromb Haemost* 86:660-667
- Butenas S, Mann KG (2002), Blood coagulation. *Biochemistry (Mosc)* 67:3-12
- Cadroy Y, Diquelou A, Dupouy D, Bossavy JP, Sakariassen KS, Sie P, Boneu B (1997), The thrombomodulin/protein C/protein S anticoagulant pathway modulates the thrombogenic properties of the normal resting and stimulated endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:520-527
- 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

- Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R (1979), The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev* 59:1-61
- Chamley-Campbell JH, Campbell GR, Ross R (1981), Phenotype-dependent response of cultured aortic smooth muscle to serum mitogens. *J Cell Biol* 89:379-383
- Chenevard R, Hurlimann D, Bechir M, Enseleit F, Spieker L, Hermann M, Riesen W, Gay S, Gay RE, Neidhart M, Michel B, Luscher TF, Noll G, Ruschitzka F (2003), Selective COX-2 inhibition improves endothelial function in coronary artery disease. *Circulation* 107:405-409
- 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
- Chesebro JH, Zoldhelyi P, Badimon L, Fuster V (1991), Role of thrombin in arterial thrombosis: implications for therapy. *Thromb Haemost* 66:1-5
- Coleman RA, Smith WL, Narumiya S (1994), International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 46:205-229
- Conway EM, Rosenberg RD (1988), Tumor necrosis factor suppresses transcription of the thrombomodulin gene in endothelial cells. *Mol Cell Biol* 8:5588-5592
- Conway EM, Van de WM, Pollefeyt S, Jurk K, Van Aken H, De Vriese A, Weitz JI, Weiler H, Hellings PW, Schaeffer P, Herbert JM, Collen D, Theilmeier G (2002), The lectin-like domain of thrombomodulin confers protection from neutrophil-mediated tissue damage by suppressing adhesion molecule expression via nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Exp Med* 196:565-577
- Coughlin SR (2001), Protease-activated receptors in vascular biology. *Thromb Haemost* 86:298-307
- Coughlin SR (2002), Protease-activated receptors in the cardiovascular system. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 67:197-208
- Crossman DC, Carr DP, Tuddenham EG, Pearson JD, McVey JH (1990), The regulation of tissue factor mRNA in human endothelial cells in response to endotoxin or phorbol ester. *J Biol Chem* 265:9782-9787
- Dahlback B, Villoutreix BO (2003), Molecular recognition in the protein C anticoagulant pathway. *J Thromb Haemost* 1:1525-1534
- Debey S, Meyer-Kirchrath J, Schrör K (2003), Regulation of cyclooxygenase-2 expression by iloprost in human vascular smooth muscle cells. Role of transcription factors CREB and ICER. *Biochem Pharmacol* 65:979-988

- DeWitt (1993), Serum and glucocorticoid regulation of gene transcription and expression of the prostaglandin H synthase-1 and prostaglandin H synthase-2 isozymes. *Arch Biochem Biophys* 306:94-102
- Dittman WA, Kumada T, Sadler JE, Majerus PW (1988), The structure and function of mouse thrombomodulin. Phorbol myristate acetate stimulates degradation and synthesis of thrombomodulin without affecting mRNA levels in hemangioma cells. *J Biol Chem* 263:15815-15822
- Dittman WA, Majerus PW (1990), Structure and function of thrombomodulin: a natural anticoagulant. *Blood* 75:329-336
- Dittman WA, Nelson SC, Greer PK, Horton ET, Palomba ML, McCachren SS (1994), Characterization of thrombomodulin expression in response to retinoic acid and identification of a retinoic acid response element in the human thrombomodulin gene. *J Biol Chem* 269:16925-16932
- Dowd NP, Scully M, Adderley SR, Cunningham AJ, Fitzgerald DJ (2001), Inhibition of cyclooxygenase-2 aggravates doxorubicin-mediated cardiac injury in vivo. *J Clin Invest* 108:585-590
- Dudek AZ, Pennell CA, Decker TD, Young TA, Key NS, Slungaard A (1997), Platelet factor 4 binds to glycanated forms of thrombomodulin and to protein C. A potential mechanism for enhancing generation of activated protein C. *J Biol Chem* 272:31785-31792
- Egan KM, Lawson JA, Fries S, Koller B, Rader DJ, Smyth EM, FitzGerald GA (2004), COX-2 Derived Prostacyclin Confers Atheroprotection on Female Mice. *Science* 306: 1954-1957
- Esmon C (2000), The protein C pathway. *Crit Care Med* 28:S44-S48
- Esmon CT (1989), The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem* 264:4743-4746
- Esmon CT (1993), Molecular events that control the protein C anticoagulant pathway. *Thromb Haemost* 70:29-35
- Esmon CT (1995), Thrombomodulin as a model of molecular mechanisms that modulate protease specificity and function at the vessel surface. *FASEB J* 9:946-955
- Esmon CT (2001a), Protein C, Protein S and Thrombomodulin. In: *Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice*, Coleman RW HJMVCAGJe, ed. Lippicott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp 335-353
- Esmon CT (2001b), Role of coagulation inhibitors in inflammation. *Thromb Haemost* 86:51-56
- Esmon CT (2002), New mechanisms for vascular control of inflammation mediated by natural anticoagulant proteins. *J Exp Med* 196:561-564
- Esmon CT, Esmon NL, Harris KW (1982), Complex formation between thrombin and thrombomodulin inhibits both thrombin-catalyzed fibrin formation and factor V activation. *J Biol Chem* 257:7944-7947

- Esmon CT, Fukudome K, Mather T, Bode W, Regan LM, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S (1999), Inflammation, sepsis, and coagulation. *Haematologica* 84:254-259
- Esmon CT, Owen WG (1981), Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:2249-2252
- Esmon CT, Taylor FB, Jr., Snow TR (1991), Inflammation and coagulation: linked processes potentially regulated through a common pathway mediated by protein C. *Thromb Haemost* 66:160-165
- Esmon NL, Carroll RC, Esmon CT (1983), Thrombomodulin blocks the ability of thrombin to activate platelets. *J Biol Chem* 258:12238-12242
- Fager G (1995), Thrombin and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 77:645-650
- Fallier-Becker P Rupp J (1990), Smooth muscle cells from rabbit aorta. In: *Cell culture techniques in heart and vessel research.* ; Piper HM, ed. New York: Springer-Verlag; pp 247-270
- Farkouh ME, Kirshner H, Harrington RA, Ruland S, Verheugt FW, Schnitzer TJ, Burmester GR, Mysler E, Hochberg MC, Doherty M, Ehsam E, Gitton X, Krammer G, Mellein B, Gimona A, Matchaba P, Hawkey CJ, Chesebro JH (2004), Comparison of lumiracoxib with naproxen and ibuprofen in the Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial (TARGET), cardiovascular outcomes: randomised controlled trial. *Lancet* 364:675-684
- Feldman CL, Stone PH (2000), Intravascular hemodynamic factors responsible for progression of coronary atherosclerosis and development of vulnerable plaque. *Curr Opin Cardiol* 15:430-440
- Ferns GA, Stewart-Lee AL, Anggard EE (1992), Arterial response to mechanical injury: balloon catheter de-endothelialization. *Atherosclerosis* 92:89-104
- FitzGerald GA (1984), Increased prostacyclin biosynthesis in patients with severe atherosclerosis and platelet activation. *N Engl J Med* 1984 Apr 26;310(17):1065-8 26:1065-1068
- FitzGerald GA (2003), COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nat Rev Drug Discov* 2:879-890
- FitzGerald GA (2004), Coxibs and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 351:1709-1711
- FitzGerald GA (2002), Cardiovascular pharmacology of nonselective nonsteroidal anti-inflammatory drugs and coxibs: clinical considerations. *Am J Cardiol* 89:26D-32D
- Folsom AR, Wu KK, Rosamond WD, Sharrett AR, Chambless LE (1997), Prospective study of hemostatic factors and incidence of coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation* 96:1102-1108
- Freedman JE (2001), Thrombin, thrombomodulin, and extracellular signal-regulated kinases regulating cellular proliferation. *Circ Res* 88:651-653

- Fuentes-Prior P, Iwanaga Y, Huber R, Pagila R, Rumennik G, Seto M, Morser J, Light DR, Bode W (2000), Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin-thrombomodulin complex. *Nature* 404:518-525
- Ghrib F, Brisset AC, Dupouy D, Terrisse AD, Navarro C, Cadroy Y, Boneu B, Sie P (2002), The expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in aortic smooth muscle cells is up-regulated in synthetic compared to contractile phenotype. *Thromb Haemost* 87:1051-1056
- Girard TJ, Warren LA, Novotny WF, Bejcek BE, Miletich JP, Broze GJ, Jr. (1989), Identification of the 1.4 kb and 4.0 kb messages for the lipoprotein associated coagulation inhibitor and expression of the encoded protein. *Thromb Res* 55:37-50
- Gorman RR, Bunting S, Miller OV (1977), Modulation of human platelet adenylate cyclase by prostacyclin (PGX). *Prostaglandins* 13:377-388
- Grey ST, Csizmadia V, Hancock WW (1998), Differential effect of tumor necrosis factor-alpha on thrombomodulin gene expression by human monocytoid (THP-1) cell versus endothelial cells. *Int J Hematol* 67:53-62
- Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C (1981), Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* 68:1370-1373
- Grinnell BW, Berg DT (1996), Surface thrombomodulin modulates thrombin receptor responses on vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 270:H603-H609
- Habenicht AJ, Goerig M, Grulich J, Rothe D, Gronwald R, Loth U, Schettler G, Kommerell B, Ross R (1985), Human platelet-derived growth factor stimulates prostaglandin synthesis by activation and by rapid de novo synthesis of cyclooxygenase. *J Clin Invest* 75:1381-1387
- Hall SW, Nagashima M, Zhao L, Morser J, Leung LL (1999), Thrombin interacts with thrombomodulin, protein C, and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor via specific and distinct domains. *J Biol Chem* 274:25510-25516
- Healy AM, Rayburn HB, Rosenberg RD, Weiler H (1995), Absence of the blood-clotting regulator thrombomodulin causes embryonic lethality in mice before development of a functional cardiovascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:850-854
- Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoort R, Lecompte T, Beguin S (2003), Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* 33:4-15
- Hemker HC, Giesen PL, Ramjee M, Wagenvoort R, Beguin S (2000), The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost* 83:589-591
- Hennan JK, Huang J, Barrett TD, Driscoll EM, Willens DE, Park AM, Crofford LJ, Lucchesi BR (2001), Effects of selective cyclooxygenase-2 inhibition on vascular responses and thrombosis in canine coronary arteries. *Circulation* 104:820-825
- Herschman HR (1991), Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu Rev Biochem* 60:281-319

- Hirokawa K, Aoki N (1991), Regulatory mechanisms for thrombomodulin expression in human umbilical vein endothelial cells in vitro. *J Cell Physiol* 147:157-165
- Hirsh J, Warkentin TE, Shaughnessy SG, Anand SS, Halperin JL, Raschke R, Granger C, Ohman EM, Dalen JE (2001), Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety. *Chest* 119:64S-94S
- Hofsteenge J, Stone SR (1987), The effect of thrombomodulin on the cleavage of fibrinogen and fibrinogen fragments by thrombin. *Eur J Biochem* 168:49-56
- Horie S, Ishii H, Matsumoto F, Kusano M, Kizaki K, Matsuda J, Kazama M (2001), Acceleration of thrombomodulin gene transcription by retinoic acid: retinoic acid receptors and Sp1 regulate the promoter activity through interactions with two different sequences in the 5'-flanking region of human gene. *J Biol Chem* 276:2440-2450
- Ikeguchi H, Maruyama S, Morita Y, Fujita Y, Kato T, Natori Y, Akatsu H, Campbell W, Okada N, Okada H, Yuzawa Y, Matsuo S (2002), Effects of human soluble thrombomodulin on experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 61:490-501
- Inoue H, Yokoyama C, Hara S, Tone Y, Tanabe T (1995), Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for interleukin-6 expression site and cAMP response element. *J Biol Chem* 270:24965-24971
- Ip JH, Fuster V, Israel D, Badimon L, Badimon J, Chesebro JH (1991), The role of platelets, thrombin and hyperplasia in restenosis after coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 17:77B-88B
- Ishii H, Uchiyama H, Kazama M (1991), Soluble thrombomodulin antigen in conditioned medium is increased by damage of endothelial cells. *Thromb Haemost* 65:618-623
- Janssen LJ, Tazzeo T (2002), Involvement of TP and EP3 receptors in vasoconstrictor responses to isoprostanes in pulmonary vasculature. *J Pharmacol Exp Ther* 301:1060-1066
- Kainoh M, Maruyama I, Nishio S, Nakadate T (1991), Enhancement by beraprost sodium, a stable analogue of prostacyclin, in thrombomodulin expression on membrane surface of cultured vascular endothelial cells via increase in cyclic AMP level. *Biochem Pharmacol* 41:1135-1140
- Kibbe MR, Johnnides C, Gleixner S, Kovesdi I, Lizonova A, Zuckerbraun B, Billiar TR, Tzeng E, Muluk SC (2003), Regulation of tissue factor expression in smooth muscle cells with nitric oxide. *J Vasc Surg* 37:650-659
- Kim AY, Walinsky PL, Kolodgie FD, Bian C, Sperry JL, Deming CB, Peck EA, Shake JG, Ang GB, Sohn RH, Esmon CT, Virmani R, Stuart RS, Rade JJ (2002), Early loss of thrombomodulin expression impairs vein graft thromboresistance: implications for vein graft failure. *Circ Res* 90:205-212
- Koyama T, Parkinson JF, Aoki N, Bang NU, Müller-Berghaus G, Preissner KT (1991a), Relationship between post-translational glycosylation and anticoagulant function of secretable recombinant mutants of human thrombomodulin. *Br J Haematol* 78:515-522

- Koyama T, Parkinson JF, Sie P, Bang NU, Müller-Berghaus G, Preissner KT (1991b), Different glycoforms of human thrombomodulin. Their glycosaminoglycan-dependent modulatory effects on thrombin inactivation by heparin cofactor II and antithrombin III. *Eur J Biochem* 198:563-570
- Kujubu DA (1991), TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 266:12866-12872
- Kurosawa S, Galvin JB, Esmon NL, Esmon CT (1987), Proteolytic formation and properties of functional domains of thrombomodulin. *J Biol Chem* 262:2206-2212
- Laemmli UK (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lalli E, Sassone-Corsi P (1994), Signal transduction and gene regulation: the nuclear response to cAMP. *J Biol Chem* 269:17359-17362
- Lamas M, Monaco L, Zazopoulos E, Lalli E, Tamai K, Penna L, Mazzucchelli C, Nantel F, Foulkes NS, Sassone-Corsi P (1996), CREM: a master-switch in the transcriptional response to cAMP. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351:561-567
- Laszik ZG, Zhou XJ, Ferrell GL, Silva FG, Esmon CT (2001), Down-regulation of endothelial expression of endothelial cell protein C receptor and thrombomodulin in coronary atherosclerosis. *Am J Pathol* 159:797-802
- Lawson JH, Mann KG (1991), Cooperative activation of human factor IX by the human extrinsic pathway of blood coagulation. *J Biol Chem* 266:11317-11327
- Lee SH (1992), Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 267:25934-25938
- Lefkovits J, Topol EJ (1994), Direct thrombin inhibitors in cardiovascular medicine. *Circulation* 90:1522-1536
- Lentz SR, Tsiang M, Sadler JE (1991), Regulation of thrombomodulin by tumor necrosis factor- α : comparison of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Blood* 77:542-550
- Li J, Garnette CS, Cahn M, Claytor RB, Rohrer MJ, Dobson J-GJ, Gerlitz B, Cutler BS (2000), Recombinant thrombomodulin inhibits arterial smooth muscle cell proliferation induced by thrombin. *J Vasc Surg* 32:804-813
- Libby P, Tanaka H (1997), The molecular bases of restenosis. *Prog Cardiovasc Dis* 40:97-106
- Loskutoff DJ, Ny T, Sawdey M, Lawrence D (1986), Fibrinolytic system of cultured endothelial cells: regulation by plasminogen activator inhibitor. *J Cell Biochem* 32:273-280
- Maier JA, Hla T, Maciag T (1990), Cyclooxygenase is an immediate-early gene induced by interleukin-1 in human endothelial cells. *J Biol Chem* 265:10805-10808

- Mann K.G. (1994), Prothrombin and Thrombin. In: *Haemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 3rd edition*, Colman R.W., ed. Lippincott, Philadelphia., pp 184-199
- Mann KG (2003), Thrombin formation. *Chest* 124:4S-10S
- Mann KG, Bovill EG, Krishnaswamy S (1991), Surface-dependent reactions in the propagation phase of blood coagulation. *Ann N Y Acad Sci* 614:63-75
- Mann KG, Butenas S, Brummel K (2003), The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:17-25
- Mann KG, Jenny RJ, Krishnaswamy S (1988), Cofactor proteins in the assembly and expression of blood clotting enzyme complexes. *Annu Rev Biochem* 57:915-956
- Maruyama I, Soejima Y, Osame M, Ito T, Ogawa K, Yamamoto S, Dittman WA, Saito H (1991), Increased expression of thrombomodulin on the cultured human umbilical vein endothelial cells and mouse hemangioma cells by cyclic AMP. *Thromb Res* 61:301-310
- Masud SP, Mackenzie R (2003), Acute coronary syndrome. *J R Army Med Corps* 149:303-310
- 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 U S A* 96:272-277
- Meyer-Kirchrath J, Debey S, Glandorff C, Kirchrath L, Schrör K (2004), Gene expression profile of the Gs-coupled prostacyclin receptor in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 67:757-765
- Mitchell JA (1994), Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone. *Br J Pharmacol* 113:1008-1014
- Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR (1976), An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263:663-665
- Moncada S, Radomski MW, Palmer RM (1988), Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol* 37:2495-2501
- 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
- Mosnier LO, Meijers JC, Bouma BN (2001), Regulation of fibrinolysis in plasma by TAFI and protein C is dependent on the concentration of thrombomodulin. *Thromb Haemost* 85:5-11

- Müller B, Maass B, Stürzebecher S, Skuballa W (1984), Antifibrillatory action of the stable orally active prostacyclin analogues iloprost and ZK 96 480 in rats after coronary artery ligation. *Biomed Biochim Acta* 43:S175-S178
- 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
- Murata T (1997), Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature* 388:678-682
- Myles T, Nishimura T, Yun TH, Nagashima M, Morser J, Patterson AJ, Pearl RG, Leung LL (2003), Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, a potential regulator of vascular inflammation. *J Biol Chem* 278:51059-51067
- Namba T, Oida H, Sugimoto Y, Kakizuka A, Negishi M, Ichikawa A, Narumiya S (1994), cDNA cloning of a mouse prostacyclin receptor. Multiple signaling pathways and expression in thymic medulla. *J Biol Chem* 269:9986-9992
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F (1999), Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 79:1193-1226
- Negishi M, Sugimoto Y, Ichikawa A (1993), Prostanoid receptors and their biological actions. *Prog Lipid Res* 32:417-434
- Nicolaes GA, Dahlback B (2002), Factor V and thrombotic disease: description of a janus-faced protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:530-538
- Nilius SM, Hasse A, Kuger P, Schrör K, Meyer-Kirchrath J (2000), Agonist-induced long-term desensitization of the human prostacyclin receptor. *FEBS Lett* 484:211-216
- Novotny WF, Brown SG, Miletich JP, Rader DJ, Broze GJ, Jr. (1991), Plasma antigen levels of the lipoprotein-associated coagulation inhibitor in patient samples. *Blood* 78:387-393
- O'Banion MK, Winn VD, Young DA (1992), cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4888-4892
- O'Reilly MA, Staversky RJ, Watkins RH, Maniscalco WM, Keng PC (2000), p53-independent induction of GADD45 and GADD153 in mouse lungs exposed to hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278:L552-L559
- Ohji T, Urano H, Shirahata A, Yamagishi M, Higashi K, Gotoh S, Karasaki Y (1995), Transforming growth factor beta 1 and beta 2 induce down-modulation of thrombomodulin in human umbilical vein endothelial cells. *Thromb Haemost* 73:812-818
- Oka M, Negishi M, Nishigaki N, Ichikawa A (1993), Two types of prostacyclin receptor coupling to stimulation of adenylate cyclase and phosphatidylinositol hydrolysis in a cultured mast cell line, BNu-2cl3 cells. *Cell Signal* 5:643-650

- Olesen M, Kwong E, Meztli A, Kontny F, Seljeflot I, Arnesen H, Lyngdorf L, Falk E (2002), No effect of cyclooxygenase inhibition on plaque size in atherosclerosis-prone mice. *Scand Cardiovasc J* 36:362-367
- Otto JC, Smith WL (1995), Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2. *J Lipid Mediat Cell Signal* 12:139-156
- Owen WG, Esmon CT (1981), Functional properties of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *J Biol Chem* 256:5532-5535
- Pang L, Nie M, Corbett L, Donnelly R, Gray S, Knox AJ (2002), Protein kinase C-epsilon mediates bradykinin-induced cyclooxygenase-2 expression in human airway smooth muscle cells. *FASEB J* 16:1435-1437
- Parkinson JF, Grinnell BW, Moore RE, Hoskins J, Vlahos CJ, Bang NU (1990), Stable expression of a secretable deletion mutant of recombinant human thrombomodulin in mammalian cells. *J Biol Chem* 265:12602-12610
- Parkinson JF, Koyama T, Bang NU, Preissner KT (1992), Thrombomodulin: an anticoagulant cell surface proteoglycan with physiologically relevant glycosaminoglycan moiety. *Adv Exp Med Biol* 313:177-188
- Polgar J, Lerant I, Muszbek L, Machovich R (1986), Thrombomodulin inhibits the activation of factor XIII by thrombin. *Thromb Res* 43:685-690
- Pratico D, Tillmann C, Zhang ZB, Li H, FitzGerald GA (2001), Acceleration of atherogenesis by COX-1-dependent prostanoid formation in low density lipoprotein receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3358-3363
- Preissner KT, Delvos U, Müller-Berghaus G (1987), Binding of thrombin to thrombomodulin accelerates inhibition of the enzyme by antithrombin III. Evidence for a heparin-independent mechanism. *Biochemistry* 26:2521-2528
- Raines EW RR (1993), Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J* 69 (Suppl):S30-S37
- Rapoport RM, Campbell AK, Bazan E (1995), Effects of PKC downregulation on norepinephrine- and prostaglandin F2 alpha-induced contraction in rat aorta. *Am J Physiol* 269:H590-H598
- 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
- Rimarachin JA, Jacobson JA, Szabo P, Maclouf J, Creminon C, Weksler BB (1994), Regulation of cyclooxygenase-2 expression in aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 14:1021-1031
- Ristimäki A, Garfinkel S, Wessendorf J, Maciag T, Hla T (1994), Induction of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 alpha. Evidence for post-transcriptional regulation. *J Biol Chem* 269:11769-11775
- Ross R (1986), The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N Engl J Med* 314:488-500

- Ross R (1993), The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801-809
- Ross R (1995), Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* 57:791-804
- Ross R (1999), Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126
- Ruf W, Dorfleutner A, Riewald M (2003), Specificity of coagulation factor signaling. *J Thromb Haemost* 1:1495-1503
- Sakamaki F, Kyotani S, Nagaya N, Sato N, Oya H, Satoh T, Nakanishi N (2000), Increased plasma P-selectin and decreased thrombomodulin in pulmonary arterial hypertension were improved by continuous prostacyclin therapy. *Circulation* 102:2720-2725
- Salem HH, Maruyama I, Ishii H, Majerus PW (1984), Isolation and characterization of thrombomodulin from human placenta. *J Biol Chem* 259:12246-12251
- Salomaa V, Matei C, Aleksic N, Sansores-Garcia L, Folsom AR, Juneja H, Chambless LE, Wu KK (1999), Soluble thrombomodulin as a predictor of incident coronary heart disease and symptomless carotid artery atherosclerosis in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study: a case-cohort study. *Lancet* 353:1729-1734
- Samuelsson B, Granstrom E, Green K, Hamberg M, Hammarstrom S (1975), Prostaglandins. *Annu Rev Biochem* 44:669-695
- Schönbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P (1999), Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 155:1281-1291
- Schrör K (2004), Eicosanoid Generation and Effects in Cardiac Muscle and Coronary Vessels. In: *The Eicosanoids*, Peter Curtis-Prior, ed. Cambridge, UK: John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, UK, pp 393-404
- Schrör K (1984), *Prostaglandine und verwandte Verbindungen*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag
- Schrör K (1997), Prostacyclin (Prostaglandin I₂) and Atherosclerosis. In: *The Endothelium in Clinical Practice*, Rubanyi G.M., Dzau V.J, eds. New York: Marcel Dekker, Inc., pp 1-44
- Schrör K, Darius H, Matzky R, Ohlendorf R (1981), The antiplatelet and cardiovascular actions of a new carbacyclin derivative (ZK 36 374)--equipotent to PGI₂ in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 316:252-255
- Schrör K, Seidel H (1988), Blood-vessel wall arachidonate metabolism and its pharmacological modification in a new in vitro assay system. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 337:177-182
- Schrör K, Verheggen R (1988), Use of human post-mortem cerebral blood vessels to study vasospasm. *Trends Pharmacol Sci* 9:71-74
- Schrör K, Weber A-A (1997), Roles of vasodilatory prostaglandins in mitogenesis of vascular smooth muscle cells. *Agents Actions Suppl* 48:63-91

- Schwamer I, Seifert R, Schultz G (1992), The prostacyclin analogues, cicaprost and iloprost, increase cytosolic Ca²⁺ concentration in the human erythroleukemia cell line, HEL, via pertussis toxin-insensitive G-proteins. *Eicosanoids* 5 Suppl:S10-S12
- Schwartz SM, Reidy MA, O'Brien ER (1995), Assessment of factors important in atherosclerotic occlusion and restenosis. *Thromb Haemost* 74:541-551
- Shenker A (1991), The G protein coupled to the thromboxane A2 receptor in human platelets is a member of the novel Gq family. *Trans Assoc Am Physicians* 104:11-20
- Shinmura K, Tang XL, Wang Y, Xuan YT, Liu SQ, Takano H, Bhatnagar A, Bolli R (2000), Cyclooxygenase-2 mediates the cardioprotective effects of the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10197-10202
- Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, Simon LS, Pincus T, Whelton A, Makuch R, Eisen G, Agrawal NM, Stenson WF, Burr AM, Zhao WW, Kent JD, Lefkowitz JB, Verburg KM, Geis GS (2000), Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *JAMA* 284:1247-1255
- Smith WL (1986), Prostaglandin biosynthesis and its compartmentation in vascular smooth muscle and endothelial cells. *Annu Rev Physiol* 48:251-262
- Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM (2000), Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 69:145-182
- Soff GA, Jackman RW, Rosenberg RD (1991), Expression of thrombomodulin by smooth muscle cells in culture: different effects of tumor necrosis factor and cyclic adenosine monophosphate on thrombomodulin expression by endothelial cells and smooth muscle cells in culture. *Blood* 77:515-518
- Solis MM, Vitti M, Cook J, Young D, Glaser C, Light D, Morser J, Wydro R, Yu S, Fink L, et al (1994), Recombinant soluble human thrombomodulin: a randomized, blinded assessment of prevention of venous thrombosis and effects on hemostatic parameters in a rat model. *Thromb Res* 73:385-394
- Solomon DH, Schneeweiss S, Glynn RJ, Kiyota Y, Levin R, Mogun H, Avorn J (2004), Relationship between selective cyclooxygenase-2 inhibitors and acute myocardial infarction in older adults. *Circulation* 109:2068-2073
- Szczeklik A, Gryglewski RJ, Nizankowski R, Musial J, Pieton R, Mruk J (1978), Circulatory and anti-platelet effects of intravenous prostacyclin in healthy men. *Pharmacol Res Commun* 10:545-556
- Tateson JE, Moncada S, Vane JR (1977), Effects of prostacyclin (PGX) on cyclic AMP concentrations in human platelets. *Prostaglandins* 13:389-397
- Taylor FB, Jr., Chang AC, Esmon CT, Hinshaw LB (1991), Baboon model of Escherichia coli sepsis: description of its four stages and the role of tumor necrosis factor, tissue factors, and the protein C system in septic shock. *Curr Stud Hematol Blood Transfus* 8-14

- Taylor FB, Jr., Peer GT, Lockhart MS, Ferrell G, Esmon CT (2001), Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo. *Blood* 97:1685-1688
- Tazawa R, Yamamoto K, Suzuki K, Hirokawa K, Hirosawa S, Aoki N (1994b), Presence of functional cyclic AMP responsive element in the 3'-untranslated region of the human thrombomodulin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 200:1391-1397
- Thompson EA, Salem HH (1986), Inhibition by human thrombomodulin of factor Xa-mediated cleavage of prothrombin. *J Clin Invest* 78:13-17
- Thompson EA, Salem HH (1987), The role of thrombomodulin in the regulation of hemostatic interactions. *Prog Hematol* 15:51-70
- Tohda G, Oida K, Okada Y, Kosaka S, Okada E, Takahashi S, Ishii H, Miyamori I (1998), Expression of thrombomodulin in atherosclerotic lesions and mitogenic activity of recombinant thrombomodulin in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1861-1869
- Topol EJ (2004), Failing the public health--rofecoxib, Merck, and the FDA. *N Engl J Med* 351:1707-1709
- Traynor AE, Cundiff DL, Soff GA (1995), cAMP influence on transcription of thrombomodulin is dependent on de novo synthesis of a protein intermediate: evidence for cohesive regulation of myogenic proteins in vascular smooth muscle. *J Lab Clin Med* 126:316-323
- Ubatuba FB, Moncada S, Vane JR (1979), The effect of prostacyclin (PGI₂) on platelet behaviour. Thrombus formation in vivo and bleeding time. *Thromb Haemost* 41:425-435
- Van Hecken A, Schwartz JI, Depre M, De L, I, Dallob A, Tanaka W, Wynants K, Buntinx A, Arnout J, Wong PH, Ebel DL, Gertz BJ, De Schepper PJ (2000), Comparative inhibitory activity of rofecoxib, meloxicam, diclofenac, ibuprofen, and naproxen on COX-2 versus COX-1 in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 40:1109-1120
- Vane JR, Botting RM (1995), Pharmacodynamic profile of prostacyclin. *Am J Cardiol* 75:3A-10A
- Viles-Gonzalez JF, Fuster V, Badimon JJ (2004), Atherothrombosis: a widespread disease with unpredictable and life-threatening consequences. *Eur Heart J* 25:1197-1207
- Wallberg-Jonsson S, Ohman ML, Dahlqvist SR (1997), Cardiovascular morbidity and mortality in patients with seropositive rheumatoid arthritis in Northern Sweden. *J Rheumatol* 24:445-451
- Walters TK, Gorog DA, Wood RF (1994), Thrombin generation following arterial injury is a critical initiating event in the pathogenesis of the proliferative stages of the atherosclerotic process. *J Vasc Res* 31:173-177
- Wasteson A, Uthne K, Westermark B (1973), A novel assay for the biosynthesis of sulphated polysaccharide and its application to studies on the effects of somatomedin on cultured cells. *Biochem J* 136:1069-1074

- Waugh JM, Li-Hawkins J, Yuksel E, Kuo MD, Cifra PN, Hilfiker PR, Geske R, Chawla M, Thomas J, Shenaq SM, Dake MD, Woo SL (2000), Thrombomodulin overexpression to limit neointima formation. *Circulation* 102:332-337
- Waugh JM, Yuksel E, Li J, Kuo MD, Kattash M, Saxena R, Geske R, Thung SN, Shenaq SM, Woo SL (1999), Local overexpression of thrombomodulin for in vivo prevention of arterial thrombosis in a rabbit model. *Circ Res* 84:84-92
- Weiler H, Isermann BH (2003), Thrombomodulin. *J Thromb Haemost* 1:1515-1524
- Weiler-Guettler H, Yu K, Soff G, Gudas LJ, Rosenberg RD (1992), Thrombomodulin gene regulation by cAMP and retinoic acid in F9 embryonal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:2155-2159
- Wen DZ (1987), Human thrombomodulin: complete cDNA sequence and chromosome localization of the gene. *Biochemistry* 26:4350-4357
- Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D (1989), Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2839-2843
- Wu KK, Aleksic N, Ballantyne CM, Ahn C, Juneja H, Boerwinkle E (2003a), Interaction between soluble thrombomodulin and intercellular adhesion molecule-1 in predicting risk of coronary heart disease. *Circulation* 107:1729-1732
- Wu KK, Matijevic-Aleksic N (2000), Thrombomodulin: a linker of coagulation and fibrinolysis and predictor of risk of arterial thrombosis. *Ann Med* 32 Suppl 1:73-77
- Xi L, Cho KW, Tu SC (1991), Cloning and nucleotide sequences of lux genes and characterization of luciferase of *Xenorhabdus luminescens* from a human wound. *J Bacteriol* 173:1399-1405
- Yoshii Y, Okada Y, Sasaki S, Mori H, Oida K, Ishii H (2003), Expression of thrombomodulin in human aortic smooth muscle cells with special reference to atherosclerotic lesion types and age differences. *Med Electron Microsc* 36:165-172
- Yu K, Morioka H, Fritze LM, Beeler DL, Jackman RW, Rosenberg RD (1992), Transcriptional regulation of the thrombomodulin gene. *J Biol Chem* 267:23237-23247
- Zimmermann KC, Sarbia M, Schrör K, Weber A-A (1998), Constitutive cyclooxygenase-2 expression in healthy human and rabbit gastric mucosa. *Mol Pharmacol* 54:536-540
- Zucker TP, Bönisch D, Muck S, Weber A-A, Bretschneider E, Glusa E, Schrör K (1998), Thrombin-induced mitogenesis in coronary artery smooth muscle cells is potentiated by thromboxane A2 and involves upregulation of thromboxane receptor mRNA. *Circulation* 97:589-595

7. VERÖFFENTLICHUNGEN

Kurzartikel (Abstracts)

K. Rabausch, A.-A. Weber, K. Schrör,

Effects of prostaglandins on the expression of thrombomodulin in human vascular smooth muscle cells

Hämostaseologie **24** (2004)

48. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung, 25. – 28. Feb. 2004, Hamburg

K. Rabausch, K. Schrör, A.-A. Weber

COX-2 Inhibition Attenuates Thrombomodulin Expression in Human Vascular Smooth Muscle Cells; *Circulation* Vol 110, 17 (Suppl): III-353 (2004)

American Heart Scientific Sessions, 7. – 12. November 2004, New Orleans, USA

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Rabausch K, Bretschneider E, Sarbia M, Fischer JW, Censarek P, Pape R, Schrör K, Weber A-A

Regulation of thrombomodulin expression in human vascular smooth muscle cells by COX-2-derived prostaglandins.

Circ Res (2005) (im Druck)

Bretschneider E, **Rabausch K**, Pape R, Heim, Weber A-A, Sarbia M, Schrör K

Activated protein C (aPC) in vascular smooth muscle cells – signal transduction, cellular effects and regulation by prostacyclin. (in preparation)

8. DANKSAGUNG

Prof. Dr. Karsten Schrör danke ich für die Überlassung des Themas und für die Betreuung dieser Arbeit. Viele anregende Gespräche brachten neue Denkansätze und Sichtweisen hervor. Besonders bedanken möchte ich mich für die Möglichkeit, an verschiedenen wissenschaftlichen Kongressen teilnehmen zu können und die damit verbundene großzügige Unterstützung.

PD Dr. Artur-Aron Weber danke ich für die Betreuung der Arbeit. Viele hilfreiche Ratschläge und Anregungen haben zur Lösung vieler Probleme beigetragen.

Prof. Dr. Hans-Dieter Höltje danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Prof. Dr. Mario Sarbia danke ich für die Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen.

Mein Dank gilt auch Beate Weyrauther für die Unterstützung in der Zellkultur. Kerstin Freidel, Petra Kuger, Irmhild Rüter und Frau Reupert danke ich für die methodische Unterstützung und ständige Hilfsbereitschaft im Labor-Alltag

Erika Lohmann und Karin Montag danke ich für die Organisation des Institutslebens und die stets hilfsbereite Unterstützung bei Problemen jeglicher Art.

Allen Kollegen danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre am Institut die sicherlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Bei Prof. Dr. Jens W. Fischer möchte ich mich herzlich für die Hilfe bei den Versuchen zur Glykosylierung von Thrombomodulin, für die Unterstützung bei der Anfertigung der immunhistochemischen Daten, wie auch für viele anregende und aufmunternde Gespräche bedanken.

Besonders danken möchte ich auch meiner Großmutter, meinen Eltern und meiner Schwester Berit, die mich in jeglicher Hinsicht unterstützt haben und mir in dieser Zeit immer zur Seite standen.

9. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides Statt, dass ich die vorliegende Doktorschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als von mir angegebene Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt, den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe, und dass diese Doktorschrift an keiner anderen Fakultät eingereicht worden ist.

Düsseldorf, den

