

**Zirkulierender Tissue Factor:
Zelluläre Quellen und Regulation**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

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

vorgelegt von

Jan Julius Stampfuß

aus Bottrop

Juli 2006

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie,
Universitätsklinikum Düsseldorf

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

Referent: Priv.-Doz. Dr. Artur-Aron Weber

Koreferentin: Prof. Dr. Stephanie Lärer

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juni 2006

1	Einleitung	1
1.1	Physiologische Bedeutung von Tissue Factor.....	1
1.2	Zirkulierender Tissue Factor – Zelluläre Quellen.....	3
1.3	(Patho)-physiologische Bedeutung des zirkulierenden Tissue Factor	5
1.4	Fragestellung	10
2	Material und Methoden	12
2.1	Substanzen.....	12
2.2	Puffer und Lösungen	13
2.3	Zellkultur.....	15
2.3.1	Isolation und Kultivierung humaner glatter Gefäßmuskelzellen	15
2.3.2	Kultivierung der monozytären Zelllinie U937	15
2.3.3	Isolation von Monozyten aus Vollblut.....	15
2.3.4	Kultivierung humaner Endothelzellen	16
2.3.5	Präparation gewaschener Thrombozyten	16
2.4	Präparation und Analyse von RNA.....	16
2.4.1	Präparation von Gesamt-RNA aus U937-Zellen.....	16
2.4.2	Quantifizierung von RNA	16
2.4.3	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	17
2.5	Western-Blotting	18
2.6	Durchflusszytometrie	19
2.7	Zymographie	20
2.8	Zweidimensionale Gelektrophorese.....	21
2.9	Bestimmung der prokoagulatorischen Aktivität	22
2.10	Perfusion von humanen glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen.....	24
2.11	Messung der P-Selectin Glycoprotein Ligand 1- Antikörperfluoreszenz im Zellüberstand.....	25
2.12	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	25
2.13	Kernfragmentierung	25
2.14	Statistik.....	26
3	Ergebnisse	27
3.1	Freisetzung von Tissue Factor aus humanen arteriellen glatten Gefäßmuskelzellen.....	27
3.1.1	Freisetzung von Tissue Factor aus humanen glatten Gefäßmuskelzellen unter statischen Bedingungen.....	27
3.1.2	Freisetzung von Tissue Factor aus humanen glatten Gefäßmuskelzellen unter Flussbedingungen.....	28
3.2	Freisetzung von Tissue Factor aus apoptotischen Zellen.....	34
3.2.1	Freisetzung von Tissue Factor aus apoptotischen humanen glatten Gefäßmuskelzellen.....	34
3.2.2	Freisetzung von Tissue Factor aus apoptotischen U937-Zellen	38
3.2.3	Expression von Tissue Factor Pathway Inhibitor und Glucose Regulated Protein 78	44
3.2.3.1	Tissue Factor Pathway Inhibitor	44
3.2.3.2	Glucose Regulated Protein 78.....	46
3.2.4	Proteomische Analyse von Zellmembranen und Mikropartikeln	48

3.3	Regulation von P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 unter apoptotischen Bedingungen	51
3.3.1	Apoptose-induzierte Herabregulation von P-Selectin Glycoprotein Ligand 1	51
3.3.2	Transkriptionelle Regulation von P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 bei Apoptose	58
3.3.3	Proteolytische Abspaltung von P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 durch Apoptose	59
3.3.4	Approximative Identifizierung der bei Apoptose P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 herabregulierenden Protease	62
3.3.5	Zelluläre Kontrolle der P-Selectin Glycoprotein Ligand 1-Abspaltung bei Apoptose	73
3.3.6	Funktion von P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 unter apoptotischen Bedingungen	74
4	Diskussion	76
4.1	Freisetzung von Tissue Factor aus humanen glatten Gefäßmuskelzellen	76
4.2	Regulation der prokoagulatorischen Aktivität bei Apoptose	79
4.3	Regulation von P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 bei Apoptose	85
4.4	Funktionelle und therapeutische Konsequenzen	95
5	Zusammenfassung	99
6	Literaturverzeichnis	101
7	Veröffentlichungen im Zusammenhang mit dieser Arbeit	111
7.1	Originalarbeiten	111
7.2	Kongressbeiträge	112
8	Danksagung	113
9	Eidesstattliche Erklärung	114
10	Lebenslauf	115

Abkürzungsverzeichnis

ACD	„Acidic citrate dextrose“
ADAM	„A disintegrin and metalloproteinase“
AU	„Artificial units“
BACE-1	„ β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1“
BSA	Bovines Serumalbumin
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
ETP	Endogenes Thrombinpotential
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
h	Stunden
HUVEC	Humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen
Inh.	Inhibitor
Min.	Minuten
MMP	Matrix-Metalloproteinase
PAF	Thrombozyten-aktivierender Faktor
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	„Platelet derived growth factor“
PE	Phycoerythrin
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PPP	Thrombozyten-armes Plasma
PRP	Thrombozyten-reiches Plasma
PSGL-1	P-Selectin Glycoprotein Ligand 1
s	Sekunden
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SMC	Glatte Gefäßmuskelzellen
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TIMP	„Tissue inhibitor of metalloproteinases“
TM	Testmedium für Thrombozyten

1 Einleitung

1.1 Physiologische Bedeutung von Tissue Factor

Tissue Factor (TF, CD142, Thromboplastin) ist der wichtigste Initiator der Blutgerinnungskaskade *in vivo* (Butenas & Mann, 2002; Pawlinski et al., 2004). Nach heutigen Vorstellungen wird eine zeitliche Abfolge von drei Gerinnungsphasen unterschieden: Initiierungsphase, Vorbereitungsphase und Propagationsphase (Hockin et al., 2002; Mann et al., 2003; Weber et al., 2006).

In der Initiierungsphase (Abb. 1) kommt es durch Endothelverletzung zu einer Interaktion von im Blut zirkulierenden aktivem FVII (FVIIa) mit dem in der Gefäßwand lokalisierten TF. Durch die Bindung des Cofaktors TF an FVIIa erhöht sich die Aktivität der Protease um den Faktor 10^6 , der Komplex TF/FVIIa (extrinsischer Xase-Komplex) aktiviert in der Folge die Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren IX (FIX) und X (FX). FXa aktiviert FV, mit dem er einen gegenüber Antithrombin geschützten Komplex bildet und zur Bildung kleiner Mengen von Thrombin führt. Diese initiale Aktivierung der Blutgerinnung wird rasch durch Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI, im Komplex mit FXa) beendet. Dabei reicht die in diesem Stadium gebildete Thrombinmenge für die Bildung eines Thrombus nicht aus. Allerdings ist dieses Thrombin in der Lage, in der Vorbereitungsphase die molekularen und zellulären Voraussetzungen zu schaffen, um große Mengen Thrombin zu bilden. Dabei spielt die Co-Aktivierung von Thrombozyten durch Thrombin (über Protease-aktivierte Rezeptoren, PAR) und Kollagen eine ebenso wichtige Rolle wie die Aktivierung der Gerinnungs(co)faktoren FV, FVIII und FXI. Der in der Initiierungsphase gebildete FIXa wird nicht durch Antithrombin (AT) gehemmt und kann zu der Thrombozytenoberfläche diffundieren. Diese Faktoren binden über ihr γ -Carboxyglutamat-reiches Ende an die durch Expression von Phosphatidylserin und γ -ethanolamin negativ geladene Oberfläche aktivierter Thrombozyten und stellen so die eigentliche „Thrombin-Bildungsmaschinerie“ dar. In der anschließenden Propagationsphase findet eine sequentielle Aktivierung von FIX und FX statt. FXa bildet einen Komplex mit FVa, der gegen TFPI und AT geschützt ist. Dieser Komplex führt zu einer effizienten Bildung von Thrombin und als Folge dessen zur Bildung eines Thrombus. Die zentrale Rolle von Thrombin (FIIa) in der Blutgerinnung zeigt sich an den Verstärkungsmechanismen in der Vorbereitungsphase, an der finalen Gerinnungsreaktion (Fibrinpolymerisation und -deposition im Thrombus) und an der Quervernetzung der Fibrinstränge durch Aktivierung von FXIII. Darüber hinaus kann Thrombin, nach Bindung an das endotheliale Thrombomodulin (TM) und nachfolgender Aktivierung von Protein C (PC), auch wichtige antikoagulatorische Wirkungen ausüben (Hemmung von FVa und FVIIa).

Rechnerisch ergibt sich ein Molekulargewicht von ca. 27 kD. Durch die posttranslationale Glykosylierung von TF wird das Protein in SDS-Polyacrylamidgelen allerdings mit einer Größe von ca. 47 kD detektiert. Diese posttranslationale Modifikation ist für die Aktivität des Proteins ohne Bedeutung, da in Bakterien hergestellter rekombinanter TF funktionell aktiv ist. Im extrazellulären Teil existieren vier Cysteinreste, die zwei intramolekulare Disulfidbrücken bilden und wichtig für die Bindung des Faktors FVII bzw. FVIIa sind (Ruf & Edgington, 1994).

TF ist normalerweise nicht in Zellen zu finden, die in direktem Kontakt mit der Blutbahn stehen. Im Gegensatz dazu wird TF in der Gefäßwand konstitutiv exprimiert, vor allem in gefäßreichen Organen wie Plazenta, Gehirn, Herz, Niere und Lunge findet sich viel TF. Die Expression von TF ist Zelltyp-spezifisch: Fibroblasten, glatte Gefäßmuskelzellen, Keratinozyten (Haut), Astrozyten (Gehirn) und Myozyten (Herz) exprimieren TF (Übersicht in Eilertsen & Osterud, 2004). Diese Zelltyp-spezifische Expression sorgt dafür, dass Gefäße unterhalb des Endothels von einem „hämostatischen Umschlag“ umgeben werden, der sofort nach Gefäßverletzung die Blutgerinnung initiieren kann.

Dieses lange Zeit gültige Paradigma, dass TF ausschließlich in der Gefäßwand exprimiert wird, wurde in den letzten Jahren intensiv diskutiert, weil aktiver, zirkulierender TF im Vollblut gesunder Menschen gefunden wurde (Giesen et al., 1999).

1.2 Zirkulierender Tissue Factor – Zelluläre Quellen

Die Arbeit von Giesen et al. (1999) hat erstmals zeigen können, dass TF auch intravaskulär zu finden und in dieser Form funktionell aktiv ist. In dieser Arbeit wurden Collagen-beschichtete Glasplättchen für 5 Min. mit humanem Blut perfundiert. In den dadurch entstandenen Thromben konnten nach entsprechender Färbung TF-positive Mikropartikel nachgewiesen werden. Außerdem führten bei der Perfusion eingesetzte TF-Antikörper zu einer Reduktion der Thrombusgröße um 70%. Aus dieser Arbeit wurde gefolgert, dass TF aus einer im Blut existierenden Quelle in Thromben inkorporiert wird und dass dieser zirkulierende TF eine existentielle Bedeutung für das Wachstum von Thromben hat.

Zirkulierender TF stand von nun an im Fokus des Interesses bei einer Vielzahl von Publikationen, die sich mit der zellulären Quelle dieses Proteins beschäftigten. Als potentielle Quellen gelten Monozyten (Palmerini et al., 2004) Thrombozyten (Siddiqui et al., 2002), SMC (Schechter et al., 2000) und Endothelzellen (Parry & Mackman, 1995). Die wichtigsten Mechanismen der Mikropartikel-Freisetzung aus diesen Zellen sind Zellaktivierung und Apoptose (Freyssinet, 2003). Die Mehrheit der im Blutplasma befindlichen Mikropartikel stammt aus Thrombozyten. Die Mikropartikel aus Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Endothelzellen zirkulieren in einer weitaus

geringeren Anzahl (Diamant et al., 2004). Monozyten sind die einzigen zirkulierenden Zellen, die nach Stimulation TF produzieren können (Ott, 2003) und es gilt als sicher, dass Monozyten eine Quelle für zirkulierenden TF sind.

Mehrere Arbeiten haben gezeigt, dass TF auch in bzw. auf Thrombozyten lokalisiert ist und in Form von Mikropartikeln sezerniert werden kann (Siddiqui et al., 2002). Andererseits erscheint unklar, woher TF auf Thrombozyten stammt, da weder Thrombozyten noch Megakaryozyten TF-mRNA besitzen (Fink et al., 2003). Es wird daher vermutet, dass TF aus anderen zellulären Quellen auf Thrombozyten übertragen wird. So haben Rauch et al. (2000) gezeigt, dass TF aus Leukozyten auf Thrombozyten übertragen werden kann.

Inwiefern Endothelzellen *in vivo* TF produzieren und als mögliche zelluläre Quelle für zirkulierenden TF in Frage kommen, ist stark umstritten. In immunhistochemischen Untersuchungen humaner Gewebe konnte kein TF im Gefäßendothel nachgewiesen werden. Verschiedene Autoren haben ebenfalls beschrieben, dass im Endothel normaler und atherosklerotischer Gefäße kein TF nachweisbar ist (Übersicht in Eilertsen & Osterud, 2004). Allerdings haben Contrino et al. (1996) zeigen können, dass bei invasivem Brustkrebs TF im Gefäßendothel vorkommt und der Endotheloberfläche eine prokoagulatorische Aktivität verleiht. Darüber hinaus existiert eine Reihe kontroverser Publikationen, ob Endothelzellen infolge einer Aktivierung mit Lipopolysaccharid (LPS) TF exprimieren können. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz dieser Befunde könnte sein, dass TF-positive Mikropartikel aus Monozyten über den P-Selectin-Rezeptor PSGL-1 (P-Selectin Glycoprotein Ligand 1) mit endotheliale P-Selectin interagieren und durch diese Wechselwirkung TF auf dem Gefäßendothel nachgewiesen werden kann (Osterud & Bjorklid, 2006). Im Gegensatz dazu ist unumstritten, dass Endothelzellen *in vitro* TF produzieren können.

SMC sind ein Teil des hämostatischen Umschlags und exprimieren TF. In gesunden Arterien ist das Expressionsniveau von TF in SMC gering. Nach einer Gefäßverletzung (z.B. durch Ballondilatation) kommt es aber zu einer raschen Induktion von TF (Marmur et al., 1993). Besonders viel TF findet sich in SMC im Bereich von atherosklerotischen Plaques (Tedgui & Mallat, 2000). Eine Arbeit von Schechter et al. (1997) hat gezeigt, dass TF in SMC in drei verschiedenen Kompartimenten vorhanden ist. In dieser Arbeit wurden humane SMC aus der Aorta und aus Koronarien mit Wachstumsfaktoren (PDGF, Thrombin) inkubiert. Die Stimulation führte zu einer zeitabhängigen Induktion von TF-mRNA und TF-Protein. Der größte Teil des Proteins wurde intrazellulär gefunden (ca. 50%) und ein weiterer Teil in einer latenten Form nahe der Plasmamembran (25-35%). Die Expression von TF auf der Zelloberfläche war transient und hatte zum Zeitpunkt des Maximums (4 h PDGF) einen Anteil von 15-25%. Eine ergänzende Arbeit dieser Autoren (Schechter et al., 2000) hat gezeigt, dass SMC *in vitro* TF-haltige Mikropartikel in das Kulturmedium sezernieren. Die Sezernierung von TF aus SMC scheint eine konstitutive Eigenschaft darzustellen, da die Zellen in dieser Arbeit weder aktiviert wurden noch Apoptose nachgewiesen werden konnte. Die wichtigsten Quellen für zirkulierenden TF scheinen dementsprechend Monozyten und SMC zu sein.

Die meisten Publikationen, die zirkulierenden TF beschreiben, weisen das Protein in einer Mikropartikel-gebundenen Form nach. Bogdanov et al. (2003) haben erstmals eine Form von TF nachgewiesen, bei der durch alternatives Splicen die transmembranäre Domäne fehlt (= löslicher TF). Eine Suche in cDNA-Datenbanken humaner Blutfraktionen ergab, dass Monozyten nachweisbare Mengen alternativ-gespliceter TF-mRNA aufweisen. Alternativ-gespliceter TF wurde im Blut von Probanden in einer Konzentration von ca. 20 pg/ml nachgewiesen. Funktionelle Messungen haben zunächst ergeben, dass diese Form von TF aktiv ist. Dieser Befund konnte von einer anderen Arbeitsgruppe jedoch nicht bestätigt werden (Butenas & Mann, 2004). Eine weitere Arbeitsgruppe hat die Aktivität von löslichem TF mit Mikropartikel-gebundenem TF verglichen. Bei diesem Vergleich war nur die Mikropartikel-gebundene Form aktiv (Sturk-Maquelin et al., 2003). Eine neuere Arbeit lieferte jedoch wieder Hinweise darauf, dass löslicher TF aktiv sein könnte (Szotowski et al., 2005).

1.3 (Patho)-physiologische Bedeutung des zirkulierenden Tissue Factor

Zirkulierender Mikropartikel-gebundener TF wurde im Blut mit einer Konzentration von 100-150 pg/ml detektiert (Butenas & Mann, 2004). Die physiologische Rolle dieses zirkulierenden TF *in vivo* ist weitgehend unklar. Einige Arbeiten konnten jedoch demonstrieren, dass TF-positive Mikropartikel in *in vitro* erzeugte Thromben integriert wird und einen Einfluss auf das Thrombuswachstum und die Fibrindeposition haben (Brisset et al., 2003; Giesen et al., 1999; Rauch et al., 2000). Eine kritische Rolle von TF für das Thrombuswachstum konnten auch Himer et al. (2003) zeigen: in einem Thrombosemodell im Kaninchen führte die Infusion von Anti-TF-Antikörpern zu einer um ca. 90% verringerten Fibrindeposition im Thrombus. TF scheint also von der luminalen Seite in Thromben inkorporiert zu werden und somit durch Thrombin- und Fibrinbildung das Wachstum zu propagieren.

Einen ersten Hinweis auf die Mechanismen, über die zirkulierender TF in Thromben inkorporiert werden könnte, lieferte die Arbeit von Palabrica et al. (1992). In dieser Arbeit führte die Infusion von Antikörpern gegen P-Selectin zu einer verringerten Fibrindeposition im Thrombus. P-Selectin ist ein Zelladhäsionsmolekül, das auf stimulierten Thrombozyten und Endothelzellen exprimiert wird und über eine Interaktion mit PSGL-1 die Adhäsion von Leukozyten vermittelt. PSGL-1 ist der wichtigste Rezeptor von P-Selectin und wird auf der Oberfläche aller Leukozyten exprimiert (Cummings, 1999). Die Arbeit von Palabrica et al. (1992) hat erstmals eine Beteiligung von P-Selectin an Blutgerinnungsvorgängen gezeigt. Die über P-Selectin vermittelte Thrombusbildung und die Beteiligung von PSGL-1 wurde von Falati et al. (2003) *in vivo* untersucht. In einem Tiermodell mit Wildtyp-, P-Selectin^{-/-}- und PSGL-1^{-/-}-Mäusen wurde durch einen Laser eine Gefäßverletzung induziert und die Akkumulation von TF, Fibrin und Thrombozyten mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert. Bei Wildtyp-Tieren kam es nach der Gefäßverletzung zu einer raschen

Akkumulation von Thrombozyten, TF und Fibrin im Thrombus (Abb. 2). Bei P-Selectin^{-/-}- und PSGL-1^{-/-}-Mäusen kam es am Ort der Gefäßverletzung zu einer Anheftung von Thrombozyten, die Akkumulation von TF und Fibrin hingegen war nur minimal. Diese Experimente zeigten, dass zirkulierender TF *in vivo* eine wichtige Rolle für das Thrombuswachstum hat und dass der Einbau von TF in wachsende Thromben in diesem Modell von P-Selectin und PSGL-1 abhängig ist.

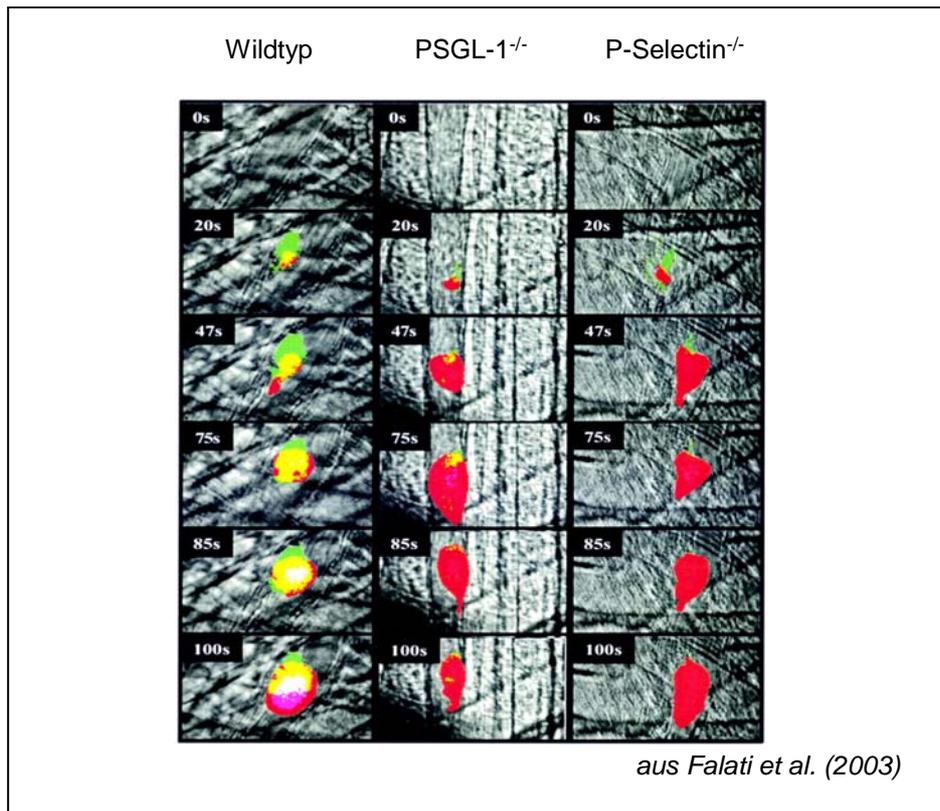


Abb. 2:

Intravitalmikroskopie der Deposition von Thrombozyten, TF und Fibrin in den Thromben von Wildtyp-, P-Selectin^{-/-}- und PSGL-1^{-/-}-Mäusen nach Gefäßverletzung. Thrombozyten = rot, TF = grün, Fibrin = blau, Thrombozyten + TF = gelb, TF + Fibrin = türkis, Thrombozyten + Fibrin = magenta, Thrombozyten + TF + Fibrin = weiß.

Die Arbeit von Falati et al. (2003) geht davon aus, dass leukozytäre Mikropartikel *in vivo* eine wichtige physiologische Funktion ausüben. Diese Hypothese wird kontrovers diskutiert. Diesbezüglich existieren in der Literatur widersprüchliche Ansichten. In zwei Arbeiten von Chou et al. (2004) und Day et al. (2004) wurde der Einfluss von leukozytären Mikropartikeln auf das Thrombuswachstum untersucht. Chou et al. (2004) haben in ihrem Modell gezeigt, dass das Thrombuswachstum ausschließlich von leukozytärem TF abhängig ist. Day et al. (2004) zeigten, dass vor allem TF aus der Gefäßwand und Mikropartikel aus Gefäßwandzellen eine wichtige Rolle bei Thrombusbildung und -wachstum

spielen. Obwohl diese Arbeiten gegensätzliche Ergebnisse lieferten, so könnten sie zumindest erklären, warum im Plasma gesunder Probanden zirkulierender TF nachzuweisen ist: wenn zirkulierender TF so wichtig für das Thrombuswachstum ist, dann hat sich zirkulierender TF in der Evolution eher als wichtiger Faktor für die Hämostase denn als pathogener Faktor, der die Thrombose vermittelt, entwickelt.

Dennoch wird eine pathophysiologische Rolle des zirkulierenden TF intensiv diskutiert. Mehrere Publikationen zeigten, dass zirkulierender TF ein wichtiger Faktor in der Etiologie verschiedener Krankheiten sein könnte: ein erhöhter TF-Spiegel wurde im Plasma von Patienten mit akuten Koronarsyndromen (ACS, Myokardinfarkt und instabile Angina pectoris), Meningokokken-Sepsis, Disseminierter Intravaskulärer Koagulation (DIC), Anti-Phospholipid-Antikörper-Syndrom und Sichelzellanämie gemessen (Eilertsen & Osterud, 2004). In verschiedenen Arbeiten wurde zwar die physiologische Rolle des TF bei der Propagierung des Thrombus gezeigt, es ist aber nicht klar, wie das Thrombuswachstum determiniert wird. Ein erhöhter TF-Plasmaspiegel könnte daher ein übermäßiges Thrombuswachstum vorantreiben. In der Folge kommt es zum Gefäßverschluss und zu einer ischämischen Schädigung. Einige Studien zeigten eine Korrelation zwischen einem erhöhten TF-Plasmaspiegel und einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse (Misumi et al., 1998; Soejima et al., 1999a; Seljeflot et al., 2003). Beim Vergleich atherosklerotischer Plaques von Patienten mit instabiler Angina pectoris im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina pectoris wurde bei den Patienten mit instabiler Angina pectoris eine erhöhte TF-Expression festgestellt (Annex et al., 1995). Ferner haben immunhistochemische Untersuchungen atherosklerotischer Plaques gezeigt, dass im Bereich der Plaques eine Vielzahl apoptotischer Zellen lokalisiert ist. Apoptose wird bei verschiedenen Zelltypen während der Entwicklung atherosklerotischer Plaques beobachtet. Man vermutet, dass die Apoptose von Endothelzellen die Atherosklerose initiiert und die Apoptose von SMC und Makrophagen zu instabilen Plaques und der entsprechenden Gefahr einer Plaqueruptur führen kann (Stoneman & Bennett, 2004). Die klinischen Manifestationen einer Plaqueruptur umfassen den plötzlichen Tod, Herzinfarkt und Schlaganfall infolge einer Thrombusbildung und der damit einhergehenden Gefäßverengung. Der verschließende Thrombus besteht neben Thrombozyten unter anderem aus Fibrin, welches ein Indiz für eine bedeutende Rolle der Gerinnungskaskade in diesem Krankheitsgeschehen ist. TF als der wichtigste Initiator der Blutgerinnung scheint dementsprechend die Thrombogenität atherosklerotischer Plaques zu determinieren. Bei der Analyse atherosklerotischer Plaques wurde eine starke TF-Expression in Makrophagen und SMC gefunden (Moreno et al., 1996). Der azelluläre Kern der Plaques weist jedoch die intensivste TF-positive Färbung auf. Funktionelle Studien haben darüber hinaus gezeigt, dass dieser Teil auch die höchste Thrombogenität aufweist (Toschi et al., 1997). Mittlerweile ist bekannt, dass der TF im azellulären Kern an Mikropartikel gebunden ist, die vor allem aus apoptotischen Monozyten (Mallat et al., 1999) und zu einem bisher unbekanntem Anteil aus apoptotischen SMC (Tedgui & Mallat, 2000) stammen.

Diese Studien zeigen, dass nach einer Plaqueruptur vermehrt TF-positive Mikro-partikel in die Zirkulation freigesetzt werden und dann durch Förderung okklusiver Thromben zu Folgeereaktionen wie Herzinfarkt oder Schlaganfall führen (Mackman, 2004).

Die im Blut gesunder Probanden gemessenen TF-Plasmaspiegel von 150 pg/ml entsprechen in etwa einer Konzentration von 3 pmol/l. Setzt man solche TF-Konzentration bei *in vitro*-Assays ein, so kommt es zu einer spontanen Gerinnung des Blutes (Butenas & Mann, 2004). Der zirkulierende TF muss also in irgendeiner Form reversibel inaktiviert werden, damit spontane Gerinnungsvorgänge verhindert werden und trotzdem die Aktivität des Proteins nach Inkorporation in einen Thrombus gewährleistet ist.

Der Begriff TF-„Encryption“ beschreibt die temporäre, reversible Inaktivierung von TF durch bisher wenig verstandene Mechanismen (Eilertsen & Osterud, 2004). Schechter et al. (1997) haben die Lokalisation von TF in drei verschiedenen Kompartimenten der SMC beschrieben, der Großteil des an der Oberfläche der Zelle lokalisierten TF ist jedoch inaktiv. Wie die Inaktivierung des TF an der Zelloberfläche erfolgt, wird kontrovers diskutiert. Mandal et al. (2005) haben an Fibroblasten gezeigt, dass eine Verminderung des Cholesterolgehalts der Zellmembran mit Methyl- β -cyclodextrin zu einer verminderten TF-Aktivität führt. Die Autoren vermuteten, dass Cholesterole die Tertiärstruktur von TF in der Weise beeinflusst, dass FVIIa und TF hochaffin interagieren können. Dietzen et al. (2004) haben den Cholesterolgehalt von HEK293-Zellen (Zelllinie aus humanen embryonalen Nierenzellen) ebenfalls mit Methyl- β -cyclodextrin beeinflusst. Dies führte jedoch zu einer erhöhten TF-Aktivität. Aus dieser Arbeit schlossen die Autoren, dass sog. „lipid rafts“ (= Mikrodomänen der Plasmamembran, die mit Sphingolipiden und Cholesterole angereichert sind und so zu einer spezifischen Ausdickung der Membran führen) für die Inhibierung der TF-Aktivität wichtig sind. Eine Arbeit von Mulder et al. (1996) zeigte, dass TF in SMC mit Caveolae assoziiert ist und dadurch in einem inaktiven Zustand gehalten wird. Caveolae sind Membraneinstülpungen, die auf der Zelloberfläche vieler Zelltypen existieren und vermutlich aus „lipid rafts“ hervorgehen. Diese Arbeit unterstützte dementsprechend die Beobachtungen von Dietzen et al. (2004). Es gibt allerdings andere Arbeiten, die dieser Form der TF-„Encryption“ widersprechen: sollte allein die Lokalisation in Caveolae ausreichen, um TF zu inaktivieren, dann sollte dort die Bildung eines aktiven TF/FVIIa-Komplexes nicht möglich sein (Giesen & Nemerson, 2000). Zellfraktionierungs-Experimente haben jedoch gezeigt, dass dieser Komplex in Caveolae gebildet wird. Allerdings unterbleibt in diesen Sphingolipid-reichen Domänen die Aktivierung von FX zu FXa. Zur Aktivierung von FXa durch TF/FVIIa ist die Gegenwart von Phosphatidylserin-reichen Zellfraktionen erforderlich (Sevinsky et al., 1996). Neben TF ist auch TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) in „lipid rafts“ und Caveolae lokalisiert. TFPI hemmt die Aktivität des TF/FVIIa/FXa-Komplexes. Die simultane Expression von TF und TFPI scheint nicht für die TF-Inhibierung in Caveolae verantwortlich zu sein (Dietzen et al., 2003). In höheren Konzentrationen kann TFPI jedoch an Clathrin-ummantelte Einstülpungen, die bei der Pinozytose eine wichtige Rolle spielen, binden. Als Folge dessen kann es

zu einer Internalisierung des TF/FVIIa-Komplexes kommen (Hamik et al., 1999). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass ein Ungleichgewicht der Sekretion von TF und TFPI zu einer erhöhten Aktivität von zirkulierendem TF führen kann (Brisset et al., 2003; Ott et al., 2001).

Ferner wird hypothetisiert, dass eine Homodimerisierung von TF die Interaktion mit FVIIa behindert (Bach & Moldow, 1997). Neuere Arbeiten aber lassen diesen Mechanismus als unwahrscheinlich erscheinen (Donate et al., 2000).

Insgesamt sind daher die Mechanismen, die zu einer Aktivierung bzw. Inaktivierung von TF führen, weitgehend ungeklärt.

1.4 Fragestellung

TF ist der wichtigste Initiator der Blutgerinnung und wird vor allem in der Gefäßwand exprimiert, um den Organismus nach Gefäßverletzung vor Blutverlusten zu schützen. Seit einigen Jahren ist bekannt, dass TF auch im Plasma gesunder Probanden in einer physiologisch aktiven Form zirkuliert. Die TF-Plasmaspiegel gesunder Probanden sind mit ca. 150 pg/ml so hoch, dass zirkulierender TF durch bisher wenig verstandene Mechanismen inaktiviert werden muss.

Die wichtigsten Quellen für zirkulierenden TF sind Monozyten und SMC. Monozyten exprimieren nach Stimulation mit Lipopolysaccharid TF und sezernieren TF-haltige Mikropartikel. Bei SMC scheint die langsame TF-Freisetzung eine konstitutive Eigenschaft der Zellen zu sein. Die langsame Freisetzung von TF aus SMC erklärt jedoch nicht, warum es nach einer Gefäßverletzung durch PTCA zu einem schnellen Anstieg von TF-haltigen Mikropartikeln im Plasma der Patienten kommt (Tutar et al., 2003).

Im Bereich von atherosklerotischen Plaques konnte eine Vielzahl von Mikropartikeln detektiert werden, die vermutlich von apoptotischen Monozyten und SMC sezerniert wurden. Die Apoptose wird daher für die besondere Thrombogenität atherosklerotischer Plaques verantwortlich gemacht. Bisher existiert in einem physiologischen System (z.B. ETP-Messung, s.u.) kein Vergleich der TF-Aktivität zwischen Mikropartikeln, die aus nicht-apoptotischen Zellen freigesetzt wurden, und solchen, die aus apoptotischen Zellen hervorgehen. Bei der am häufigsten eingesetzten Methode zur Messung der TF-Aktivität wird die Bildung von Faktor Xa in Gegenwart von Faktor VIIa evaluiert. Bei dieser Methode wird Faktor VIIa jedoch in einer Konzentration eingesetzt, die die physiologische Konzentration dieses Enzyms um den Faktor 100 überschreitet. Außerdem wird der Einfluss antikoagulatorischer Proteine (z.B. AT, TFPI, Protein C) bei dieser Methode nicht berücksichtigt. Die Bildung des wichtigsten Produkts der Blutgerinnung, Thrombin, wird ebenfalls nicht gemessen. Die Messung des endogenen Thrombinpotentials (ETP) bietet die Möglichkeit, die Thrombinbildung in Abhängigkeit von der TF-Konzentration zu messen. Bei dieser Methode wird die Thrombinbildung in einem physiologischen System (Blutplasma) gemessen. Die Thrombinbildung wird in diesem System in Abhängigkeit von der TF-Konzentration induziert. Alle Enzyme und Co-Faktoren der Gerinnungskaskade liegen bei dieser Methode in physiologischen Konzentrationen vor. Wenn TF-positive Mikropartikel als TF-Quelle eingesetzt werden, so können aus den Ergebnissen dieser Methode sehr wahrscheinlich Rückschlüsse auf die Thrombogenität dieser Mikropartikel *in vivo* gezogen werden. Neben der Messung der Thrombogenität von TF-positiven Mikropartikeln ist es auch wichtig abschätzen zu können, inwiefern die Mikropartikel in wachsende Thromben inkorporiert werden können. Als wichtigster Mechanismus, über den zirkulierende Mikropartikel in Thromben inkorporiert werden können, wird eine Interaktion von P-Selectin und PSGL-1 postuliert (Falati et al., 2003). In der Arbeit von Falati et al. (2003) wurden jedoch ausschließlich TF-positive

Mikropartikel untersucht, die durch Zellaktivierung generiert wurden. Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass auch Mikropartikel zirkulieren, die aus apoptotischen Monozyten freigesetzt wurden (Mallat et al., 1999). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Extrakte atherosklerotischer Plaques hohe Spiegel freigesetzter apoptotischer Mikropartikel enthalten. Rupturierte atherosklerotische Plaques können dementsprechend zu einer Quelle zirkulierender TF-positiver Mikropartikel werden (Rauch et al., 2001). Es ist unklar, ob diese Mikropartikel, die zu einem Großteil aus apoptotischen Monozyten stammen, auch über eine Interaktion zwischen P-Selectin und PSGL-1 in Thromben inkorporiert werden können, da keine Arbeiten bezüglich der Regulation von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen existieren.

Vor diesem Hintergrund sollen in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Unter welchen Bedingungen können SMC zu einer funktionell bedeutsamen zellulären Quelle für zirkulierenden TF werden?
2. Gibt es Unterschiede hinsichtlich der prokoagulatorischen Aktivität zwischen Mikropartikeln, die aus nicht-apoptotischen im Vergleich zu apoptotischen Zellen freigesetzt werden und welche Mechanismen liegen einer möglichen unterschiedlichen prokoagulatorischen Aktivität zu Grunde?
3. Gibt es eine Regulation von PSGL-1 in monozytären Mikropartikeln bzw. in monozytären Zellen unter apoptotischen Bedingungen?

2 Material und Methoden

2.1 Substanzen

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

1,10-Phenanthrolin	Sigma, München
Aktinomycin D	Sigma, München
Aprotinin	Sigma, München
Calpain-Inhibitor I	Calbiochem, San Diego, USA
Caspase-1 Inhibitor I	Calbiochem, San Diego, USA
Coomassie Brilliant-Blau R-250	BioRad, München
Cycloheximid	Sigma, München
Etoposid	Sigma, München
Galardin	Calbiochem, San Diego, USA
Hoechst 33342	Sigma, München
Iloprost (Ilomedin [®] Infusionskonzentrat)	Schering, Berlin
Leupeptin	Sigma, München
MMP Inhibitor II	Calbiochem, San Diego, USA
MMP-2/MMP-9 Inhibitor II	Calbiochem, San Diego, USA
MMP-3 Inhibitor II	Calbiochem, San Diego, USA
MMP-8 Inhibitor I	Calbiochem, San Diego, USA
MMP-9/MMP-13 Inhibitor I	Calbiochem, San Diego, USA
Na-EDTA	Calbiochem, San Diego, USA
N-Ethylmaleimid	Sigma, München
Pefabloc SC	Sigma, München
Pepstatin A	Sigma, München
Phorbol-12-myristat-13-acetat	Axxora, Grünberg
Phosphoramidon	Sigma, München
Ruthenium-Bathophenanthrolin-Disulfonat	Sigma, München
Staurosporin	Sigma, München
TAPI-0	Biomol, Hamburg
Z-Gly-Gly-Arg-AMC	Bachem, Bubendorf, Schweiz
β-Sekretase Inhibitor IV	Calbiochem, San Diego, USA

2.2 Puffer und Lösungen

Die nachfolgend aufgelisteten Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders vermerkt, mit entmineralisiertem Wasser hergestellt.

ACD:

85 mM Trinatriumcitrat x 2 H₂O; 65 mM Citronensäure x H₂O; 111 mM Glucose

Amido-Schwarz-Entfärbelösung:

25% Isopropanol; 10% Essigsäure

Amido-Schwarz-Färbelösung:

0,1% Amido-Schwarz; 25% Isopropanol; 10% Essigsäure

Annexin-V-Bindepuffer:

0,1 M Hepes pH 7,4; 1,4 M NaCl; 25 mM CaCl₂

Blot-Puffer:

190 mM Glycin; 25 mM Tris; 20% Methanol

Coomassie-Blau-Färbelösung:

0,2% Coomassie-Brilliant-Blau; 40% Methanol, 10% Essigsäure

Entfärbelösung (Ruthenium-Färbung):

40% Ethanol, 10% Essigsäure

Entwickler (Silber-Färbung):

2,5% Natriumcarbonat; 0,01% Formaldehyd

Equilibrierungspuffer:

6 M Harnstoff; 30% Glycerol; 2% SDS in 0,05 M Tris/HCl pH 8,8

Fixierer (Silber-Färbung):

40% Ethanol; 10% Essigsäure

Fixierlösung (Röntgenfilm):

1% Kaliumdisulfit; 20% Natriumthiosulfat x 5 H₂O

Fixierlösung (Ruthenium-Färbung):

30% Ethanol; 10% Essigsäure

FluCa:

Fluo-Puffer mit 100 mM CaCl₂ 5 Min. bei 37°C inkubieren; danach 50 µl des fluorogenen Substrats hinzufügen und die Lösung 2 x vortexen.

Fluo-Puffer:

20 mM Hepes pH 7,35; 60 g/L BSA

Fluorogenes Substrat:

100 mM Z-Gly-Gly-Arg-AMC in DMSO

Hypotoner Puffer:

10 mM Tris/HCl pH 7,5; 250 mM Sucrose; 5 mM PMSF

Lämmli-Puffer (1x):

62,5 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-Puffer (pH 7,0); 50 mM DL-Dithiothreitol; 10% Glycerin; 2% SDS; 0,001% Bromphenolblau

Laufpuffer:

190 mM Glycin; 25 mM Tris pH 8,5; 0,1% SDS

Lysepuffer:

8,1 M Harnstoff; 1,1 M Thioharnstoff; 20 mM Tris pH 8,8; 4% CHAPS;
frisch zusetzen: 0,2% - 0,4% Biolyte 3-10 (5 - 10 µl/ml)

PBS:

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 8,3 mM Na₂HPO₄

Renaturierungspuffer:

50 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM CaCl₂; 1 µM ZnCl₂; 1% Triton X-100; 0,02% NaN₃

Stopplösung (Silber-Färbung):

1,4% Dinatrium-EDTA

TBS:

10 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl

TBST:

TBS + 0,1% Tween 20

TBST-BSA:

TBST + 5% BSA

TBST-M:

TBST + 5% Magermilchpulver

Testmedium für Thrombozyten:

134 mM NaCl; 12 mM NaHCO₃; 2,9 mM KCl; 0,36 mM NaH₂PO₄ x 2H₂O; 1 mM MgCl₂; 5 mM Hepes pH 7,4

Transferpuffer:

190 mM Glycin; 25 mM Tris pH 8,5; 20% Methanol

Waschpuffer für Thrombozyten:

113 mM NaCl; 4 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O; 24 mM NaH₂PO₄ x 2H₂O; 4 mM KH₂PO₄ pH 6,5

2.3 Zellkultur

2.3.1 Isolation und Kultivierung humaner glatter Gefäßmuskelzellen

Humane glatte Gefäßmuskelzellen (SMC) wurden nach der Explant-Technik aus der Arteria mammaria isoliert (Rabausch et al., 2005). Die Kultivierung erfolgte in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, Invitrogen, Karlsruhe) mit 15% fötalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin bei 37° C unter Begasung mit 5% CO₂. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA (0,05%/0,5 mM) passagiert. Die Versuche wurden mit Zellen der Passagen 4-13 durchgeführt.

2.3.2 Kultivierung der monozytären Zelllinie U937

Die Kultivierung der U937-Zellen (1593, ATCC, LGC Promochem, Wesel) erfolgte in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Glutamax Medium (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe), supplementiert mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin, bei 37° C unter Begasung mit 5% CO₂. Vor den Experimenten wurden die Zellen 5 Min. bei 150 x g pelletiert und nach Resuspension in serumfreiem RPMI Glutamax Medium mit 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin 12 h inkubiert.

2.3.3 Isolation von Monozyten aus Vollblut

Venöses Vollblut wurde nach Vorlage von Citrat (ACD) im Verhältnis 1:9 bezogen auf das Endvolumen gesammelt. Anschließend wurde das citrathaltige Blut im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt.

In einem 50 ml Falcon-Röhrchen wurden 20 ml Ficoll Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) vorgelegt und vorsichtig mit dem verdünnten Vollblut überschichtet. Danach erfolgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 400 x g. Die obere Phase wurde vorsichtig abgesaugt, die Thrombozyten- und Leukozyten-enhaltende Interphase wurde mit einer Pipette in ein frisches Gefäß überführt. Zur Abtrennung der Thrombozyten wurde die überführte Zellsuspension mit dem 3-fachen Volumen PBS verdünnt und 10 Min. mit 100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet erneut mit PBS gewaschen. Abschließend wurden die Zellen in RPMI Glutamax Medium mit 5% FCS, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin resuspendiert und in Zellkulturschalen überführt. Diese Zellsuspension enthielt ca. 10% Monozyten und 90% Lymphozyten. Nach einer Stunde adhärten die Monozyten am Boden der Zellkulturschale, die Lymphozyten wurden durch Absaugen des Mediums und durch Waschen mit PBS entfernt. Die Monozyten wurden danach wieder mit RPMI Glutamax Medium mit 5% FCS, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin überschichtet und 12 h bis zum Versuchsbeginn inkubiert. Die

Monozyten wurden durchflusszytometrisch mittels Streulichteigenschaften und Bindung von Anti-CD14-PE-Antikörpern (B-A8, Diaclone, Milenia Biotech, Bad Nauheim) identifiziert.

2.3.4 Kultivierung humaner Endothelzellen

Die Kultivierung von HUVEC (c-12200, Promocell, Heidelberg) erfolgte in Endothelial cell basal medium (Promocell, Heidelberg) bei 37° C unter Begasung mit 5% CO₂. Nach erreichter Konfluenz wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA (0,05%/0,5 mM) passagiert.

2.3.5 Präparation gewaschener 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 (Direktor Prof. Dr. R.E. Scharf) bezogen.

Das buffy-coat-Blut wurde im Verhältnis 1:7 mit ACD versetzt und für 10 Min. bei Raumtemperatur und 300 x g zentrifugiert. Das derart gewonnene PRP wurde abgehoben und nochmals mit ACD im Verhältnis 1:10 versetzt. Zu dieser Suspension wurde PGE₁ in einer Endkonzentration von 50 nM zugegeben, die Thrombozyten wurden durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 650 x g pelletiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Thrombozytenpellet in 45 ml Waschpuffer + 50 nM PGE₁ resuspendiert. Durch erneute Zentrifugation (650 x g, 10 Min.) wurden die Thrombozyten ein weiteres Mal pelletiert und abschließend im Testmedium (1,5-fache Menge des PRP) resuspendiert. Die Suspensionen wurden aliquotiert bei -20° C gelagert.

2.4 Präparation und Analyse von RNA

2.4.1 Präparation von Gesamt-RNA aus U937-Zellen

Gesamt-RNA aus U937-Zellen wurde mittels High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.4.2 Quantifizierung von RNA

Die Konzentration und Reinheit der präparierten RNA wurde durch Messung der Absorption einer 1:50 verdünnten Lösung bei 260 nm und 280 nm in einem Genequant II DNA/RNA Calculator (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bestimmt. Da das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm und das

von aromatischen Aminosäuren bei 280 nm liegt, bietet der Quotient aus beiden Absorptionswerten (ratio 260/280 nm) eine gute Abschätzung der RNA-Reinheit und sollte zwischen 1,5 und 2 liegen. $1 \text{ OD}_{260} = 40 \text{ } \mu\text{g/ml RNA}$.

2.4.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die qPCR wurde in einem Zweischnitt-Protokoll durchgeführt. Im ersten Schritt wurde die cDNA aus 1 μg RNA nach Angaben des Herstellers (High Capacity cDNA Archive Kit; Applied Biosystems, Darmstadt) synthetisiert. Die Synthese erfolgte in einem Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg.

Im zweiten Schritt wurde die PCR mit 50 ng cDNA in einem Real-Time PCR System 7300 (Applied Biosystems, Darmstadt) und mittels TaqMan[®]-Technologie durchgeführt. Die qPCR wurde mit den TaqMan[®]-Assays Hs00356602_m1 (PSGL-1) sowie Hs99999905_m1 (GAPDH, endogene Kontrolle) und TaqMan[®] Universal PCR Master Mix durchgeführt. Alle Produkte wurden von Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, bezogen. Die Daten wurden mittels Sequence Detection Software v1.2.3. detektiert.

Die PCR erfolgte in Versuchsansätzen á 20 μl :

10 μl Mastermix
1 μl Assay-Mix
9 μl Probe

Die PCR-Bedingungen waren wie folgt:

2 Min.,	50 °C	} 40 Zyklen
10 Min.,	95 °C	
15 Sekunden,	95 °C	
60 Sekunden,	60 °C	

Die TaqMan[®]-Technologie zeichnet sich durch eine spezifische Detektion der PCR Produkte aus. Eine fluoreszenzmarkierte Sonde (20-30 Nukleotide) bindet spezifisch an eine Sequenz der Matrize. Der fluoreszierende Reporterfarbstoff (FAM, 6-Carboxyfluorescein) ist kovalent an das 5'-Ende der Sonde geknüpft. Die Fluoreszenz dieses Farbstoffs wird durch einen Quencher (TAMRA, 6-Carboxytetramethylrhodamin) unterdrückt, der sich am 3'-Ende der Sonde befindet. Trifft die Ampli-Taq-DNA-Polymerase während der Extensionsphase auf die Sonde, so wird die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase aktiviert und die Sonde hydrolysiert. Durch die Hydrolyse wird die räumliche Nähe zwischen dem Reporterfarbstoff und dem Quencher unterbrochen. Das dabei gebildete Signal ist stark sequenzspezifisch, weil unspezifisch gebundene Sondenmoleküle ohne Aktivierung der Exonukleaseaktivität verdrängt werden. Nicht hydrolysierte Sondenmoleküle zeigen keine Fluoreszenz.

2.5 Western-Blotting

Für die Untersuchungen mittels Western-Blot wurden die Zellen durch Zugabe von 1 x Lämmli-Puffer lysiert. Das Lysat wurde anschließend kurz sonifiziert und 5 Min. bei 90° C denaturiert. Die Proben wurden aliquotiert bei -20° C bis zur Western-Blot-Analyse gelagert.

Zelluläre Mikropartikel wurden durch Ultrazentrifugation (100000 x g, 60 Min.) gewonnen. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde bis auf 30 µl abgesaugt und mit 10 µl 4x Lämmli versetzt. Die Proben wurden anschließend 5 Min. bei 90° C denaturiert und bis zur Western-Blot-Analyse bei -20°C gelagert.

Die Auftrennung und Analyse der Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE). Die Acrylamidkonzentration im Sammelgel betrug 4%, die Konzentration des Trenngels variierte je nach Größe der zu untersuchenden Proteine zwischen 8 und 15%. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für 45-60 Min. bei 180 V (Mini-Protean 3 Cell, BioRad, München). Nach der Auftrennung im Gel wurden die Proteine auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)- Membran (Immobilon-P, Millipore, Bedford, USA) übertragen. Die PVDF-Membran wurde in Methanol aktiviert, anschließend mit Wasser gespült (5 Min.) und in Transferpuffer equilibriert. Der Transfer erfolgte in einer ‚Semi-Dry‘-Blot-Apparatur (Biorad, München) bei 10 V für 50-60 min.

Proteine aus Zelllysaten wurden mittels „Lumi-Light Western Blotting Substrate“, Proteine aus Mikropartikeln mittels „ECL Advance Western Blotting Detection Kit“ detektiert:

Detektion mit „Lumi-Light Western Blotting Substrate“:

Um die unspezifische Bindung von Antikörpern an die proteinbindenden Membranen zu verhindern, wurden die Membranen nach dem Proteintransfer für 1-3 h in TSBT-M (5%) oder TBST-BSA (5%) inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (Tabelle 1) für 1-2 h bei Raumtemperatur oder alternativ über Nacht bei 4° C.

Nach 3-fachem Waschen mit TBST (3 x 15 Min.) erfolgte die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper (1:3000) für 1 h. Vor der Detektion der Proteine wurde die Membran erneut 3 x 15 Min. gewaschen. Die Proteine wurden mit Hilfe des „Lumi-Light Western Blotting Substrate“ (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers detektiert. Bei dieser Methode wird das Substrat (Luminol) durch die Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper mittels H₂O₂ oxidiert. Die entstehende Chemilumineszenz wird durch Exposition der Membran auf einen Röntgenfilm (HyperfilmTM ECLTM, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) visualisiert.

Name	Quelle	Verdünn.	Hersteller	Kat.-Nr.
Anti-ADAM-9	Kaninchen	1:1000	Biomol	SA-376
Anti-ADAM-10	Kaninchen	1:1000	Calbiochem	422751
Anti-ADAM-17	Kaninchen	1:1000	Biomol	SA-415
Anti-BACE	Kaninchen	1:1000	Calbiochem	195102
Anti-Caspase-1	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	2225
Anti-Caspase-3	Kaninchen	1:500	Cell Signaling	9662
Anti-GRP78	Maus	1:500	BD Biosciences	610978
Anti-PARP	Kaninchen	1:500	Cell Signaling	9542
Anti-PSGL-1	Maus	1:1000	BD Biosciences	556052
Anit-PSGL-1	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz	sc-20929
Anti-TF	Ziege	1:2000	American Diagnostica	4501
Anti-TFPI	Kaninchen	1:500	American Diagnostica	4901

Tabelle 1:

Antikörper und Antikörperverdünnungen zur Detektion von Proteinen aus Zelllysaten.

Detektion mit „ECL Advance Western Blotting Detection Kit“:

Bei der Detektion von Proteinen mittels „ECL Advance Western Blotting Detection Kit“ (GE Healthcare, München) wird Lumigen[®]-TMA-6 durch die Peroxidase oxidiert, dies führt zu einer wesentlich stärkeren Lumineszenz als die Oxidation von Luminol.

Die proteinbeladenen Membranen wurden über Nacht mit einer speziellen Blocklösung prähybridisiert. Die Inkubation mit dem Erstantikörper (1:5000) erfolgte für 1,5 h, die Inkubation mit dem Zweitantikörper (1:20000) für 1 h. Die Detektion der Proteine erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die entwickelten Röntgenfilme wurden mit einem GS-800 Calibrated Densitometer (BioRad, München) eingescannt und anschließend mit Hilfe der Software Quantity One[®] (BioRad, München) ausgewertet.

2.6 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrische Messung der Streulichteigenschaften, Isotyp- und Antikörperfluoreszenzen wurde in einem EPICS XL (Beckman Coulter, Krefeld) durchgeführt. Zellpopulationen wurden anhand ihrer Streulichteigenschaften eingegrenzt. Mikropartikel wurden anhand ihrer Streulichteigenschaften identifiziert. U937-Zellen wurden durch das Binden von Anti-CD45-PE-Antikörpern (A07785, Beckman Coulter, Krefeld) und Thrombozyten durch das Binden von Anti-CD61-FITC-Antikörpern (1758, Beckman Coulter, Krefeld) validiert. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper auszuschließen, wurden sog. Isotyp-Kontrollen (Isotyp) mit fluoreszenzmarkierten Immunglobulinen (PE:

IM0670, FITC: A07795 Beckman Coulter, Krefeld) durchgeführt. Die jeweilige Isotyp-Kontrolle stammte aus der gleichen Spezies (Maus) und war an den gleichen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt wie der jeweils eingesetzte Antikörper. Die Detektion erfolgte bei logarithmischer Amplifikation. Es wurden 5000 bzw. 10000 Zellen oder Mikropartikel mit der System II-Software analysiert, die Parameter „Mittlere Fluoreszenzintensität“ (MnI) und „Prozent positive Ereignisse“ wurden ausgewertet.

Der TF-Nachweis in Mikropartikeln von SMC erfolgte in den Perfusatfraktionen durch Inkubation von 2 µl Anti-TF-FITC-Antikörper (BM 740, Acris Antibodies, Hiddenhausen) mit 100 µl Perfusat (30 Min.). Der TF-Nachweis auf U937-Zellen und -Mikropartikeln erfolgte durch Inkubation von 5 µl Anti-TF-FITC-Antikörper (4508 CJ, American Diagnostica, Pfungstadt) mit 50 µl Zellsuspension bzw. 50 µl zellfreiem Überstand.

Der PSGL-1-Nachweis erfolgte durch einen Anti-PSGL-1-PE-Antikörper (556055, BD Biosciences, Heidelberg). Dazu wurden 3 µl des Antikörpers mit 50 µl Zellsuspension für 30 Min. inkubiert.

Als Hinweis auf Apoptose wurden negativ geladene Phospholipide auf der Membranoberfläche durch Bindung von Annexin-V gemessen. Dazu wurden 5 µl Annexin-V-PE mit 50 µl Zellsuspension für 30 Min. inkubiert. Das Volumen wurde anschließend mit 500 µl Annexin-V-Bindpuffer ergänzt, um die dauerhafte Annexin-V-Bindung zu gewährleisten. Annexin bindet nur in Gegenwart von Ca^{++} an negativ geladene Phospholipide. Eine Negativkontrolle wurde daher bei Messung der Annexin-V-Bindung durch Zusatz von EDTA (5 mM) zum Annexin-V-Bindpuffer durchgeführt.

Die Aggregatbildung von U937-Zellen mit unstimulierten bzw. stimulierten (PAR-1-aktivierendes Peptid, PAR-1-AP, 30 µM, 15 Min.) Thrombozyten wurde nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur und anschließenden Antikörperfärbung der Zellen gemessen. 50 µl der Mischzell-Suspension wurden mit je 5 µl Anti-CD61-FITC-Antikörper und Anti-CD45-PE-Antikörper versetzt.

2.7 Zymographie

Die Zymographie diente dem Nachweis der Gelatinase-Aktivität der Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2) sowie der MMP-9 im Zellüberstand und in Zelllysaten.

Zellen und Zellüberstand wurden durch Zentrifugation bei 1000 x g für 1 Min. voneinander getrennt. Die Zellen wurden 1 x mit PBS gewaschen und in einem nicht-reduzierenden 1x Lämmli-Puffer lysiert. Der Zellüberstand wurde erneut zentrifugiert (5 Min., 10000 x g) und anschließend mit 4 x Lämmli-Puffer (ebenfalls ohne DTT) versetzt. Die Proben wurden nicht durch Hitzeeinwirkung denaturiert, weil dies zum Aktivitätsverlust der Enzyme geführt hätte.

Die Enzyme wurden in einem 7%-igen SDS-Polyacrylamidgel, das 0,7 mg/ml Gelatin enthielt, aufgetrennt. Das Gel wurde bei 37° C über Nacht im Renaturierungspuffer inkubiert und nachfolgend mit Coomassie-Blau gefärbt. Als Zeichen der Aktivität erscheint eine ungefärbte Negativbande auf Höhe des entsprechenden Molekulargewichts der Gelatinase.

2.8 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Das Proteom der Zellmembranen und Mikropartikel apoptotischer und nicht-apoptotischer Zellen wurde mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese untersucht. Die Zellmembranen wurden nach der Methode von (Barber & Jamieson, 1970) präpariert. 25 ml einer Suspension von U937 Zellen wurden 1 x mit PBS gewaschen, auf ein Volumen von 2 ml konzentriert und vorsichtig über einen Glycerol/PBS-Gradienten (0–40%) geschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 30 Min. mit 1000 x g und danach für 15 Min. bei 3000 x g, um die Zellen zu pelletieren. Die glycerolbeladenen, hyperosmolaren Zellen wurden nach der Zentrifugation in einem hypotonen Puffer (3 ml) durch 10 vorsichtige Hübe im Glashomogenisator lysiert. Das Lysat wurde nachfolgend vorsichtig auf ein Sucrose-Kissen (27% (m/v)) geschichtet und 120 Min. mit 70000 x g zentrifugiert. Die Zellmembranen befanden sich als schmale Bande in der Interphase, im Zentrifugationspellet befanden sich u.a. Zellkerne, Mitochondrien und nicht-lysierte Zellen. Die Zellmembranen (ca. 1,5 ml) wurden isoliert, mit dem hypotonen Puffer auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt und danach für 60 Min. mit 70000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 1 ml abgesaugt, in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup überführt und erneut ultrazentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µl Lysepuffer aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

Mikropartikel wurden pro Versuchsgruppe aus 60 ml Zellsuspension isoliert. Die Zellen wurden durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 3000 x g abgetrennt. Der zellfreie Überstand wurde in 6 x 9 ml-Fractionen durch Ultrazentrifugation (100000 x g, 60 Min.) auf je 200 µl eingengt und in einem 1,5 ml Eppendorf-Cup vereinigt. Danach erfolgte wieder eine Ultrazentrifugation (100000 x g, 60 Min.), anschließend wurde der Zellüberstand vorsichtig komplett abgesaugt. Das Pellet wurde in 200 µl Lysepuffer aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

Die Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von (Dieckmann-Schuppert & Schnittler, 1997) durchgeführt. In der isoelektrischen Fokussierung (IEF) sollten 200 – 500 µg analysiert werden.

Vor der IEF wurde den Proben DTT (20 mM) zugesetzt und dieser Ansatz 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe wurde anschließend in die IEF-Kammer pipettiert, der IEF-Gelstreifen vorsichtig über die Probe gelegt und zum Ausschluss von Luftsauerstoff mit Mineralöl überschichtet. Die Rehydratisierung des IEF-Gelstreifens erfolgte für 14 h bei 50 V. Die anschließende IEF wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

150 V 30 Min.

300 V 30 Min.

1000 V 30 Min.

1000 V – 8000 V 1 h, linear; 60000 – 100000 Vh

Nach der IEF wurden die IEF-Gelstreifen bis zur Größenauffrennung der Proteine bei -80 °C aufbewahrt. Vor der Größenauffrennung wurde eine Reduktion der Proteine im IEF-Gelstreifen durch Inkubation für 2 x 10 Min. mit je 3 ml Equilibrierungspuffer/DTT (2,5% (m/v)) durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine durch Inkubation für 2 x 10 Min. mit je 3 ml Equilibrierungspuffer/Iodacetamid (48 mg/ml) alkyliert. Danach wurden die IEF-Gelstreifen kurz mit

Laufpuffer gewaschen, über das Trenngel (10% Polyacrylamid) gelegt und durch Überschichtung mit Agarose (1% in Laufpuffer + Bromphenolblau) fixiert. Die Größenauftrennung erfolgte für 45 Min. bei 45 V und 6-10 h bei 200 V.

Die Gele mit Proben aus Plasmamembranen wurden über Nacht fixiert und danach 4 x 30 Min. in Ethanol (20%) gewaschen. Die Färbung der Gele erfolgte durch Inkubation mit Ruthenium-Bathophenanthrolin-Disulfonat (1 μ M in H₂O, 6 h). Danach wurden die Gele 3 x 15 Min. mit Wasser gewaschen und 15 h mit Entfärbelösung entfärbt. Die Gele wurden erneut 2 x mit Wasser gewaschen und die Proteine fluoreszenzspektrophotometrisch bei 532 nm Exzitationswellenlänge und 630 nm Emissionswellenlänge detektiert.

Die Gele mit den Proteinproben aus Mikropartikeln wurden mittels Silberfärbung detektiert. Dazu wurden die Gele zunächst über Nacht fixiert. Die Gele wurden anschließend 5 x 8 Min. mit demineralisiertem Wasser gewaschen und nachfolgend mit einer 0,25%-igen Silbernitratlösung inkubiert. Die Gele wurden danach 4 x 1 Minute mit demineralisiertem Wasser gewaschen und anschließend entwickelt. Die Entwicklung wurde nach ca. 10 Min. gestoppt.

2.9 Bestimmung der prokoagulatorischen Aktivität

Die Messung der Thrombinbildung (Endogenes Thrombinpotential, ETP) ist eine Methode, um die Funktion des Blutgerinnungssystems zu testen. Mit Hilfe dieser Methode kann die Wirksamkeit verschiedener Antikoagulanzen sowie Defizite in der Bildung von Gerinnungsfaktoren analysiert werden. Hemker et al. (2002) haben eine Methode etabliert, bei der die Thrombinbildung automatisiert und kalibriert gemessen werden kann. Bei der Messung des endogenen Thrombinpotentials wird Citrat-antikoaguliertes Plasma mit einer TF-Quelle und negativ geladenen Phospholipiden inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe eines Recalcifizierungspuffers (FluCa), der das fluorogene Thrombin-Substrat Z-Gly-Gly-Arg-AMC (Bachem, Bubendorf, Schweiz) enthält, gestartet. Nach spezifischer proteolytischer Spaltung durch Thrombin wird der Fluoreszenzfarbstoff AMC (7-Amino-4-methylcumarin) freigesetzt, dessen Fluoreszenz bei 390 nm Exzitations- und 460 nm Emissionswellenlänge gemessen werden kann. Dieses Substrat wird nur sehr langsam durch Thrombin umgesetzt. Aus diesem Grund erfolgt keine Erschöpfung des Substrates, eine kontinuierliche Aufzeichnung der pro Zeit gebildeten Thrombinmenge wird ermöglicht. Die Thrombinaktivität wird durch einen Vergleich des Fluoreszenzsignals einer thrombinbildenden Probe mit dem Signal eines Kalibrators mit einer stabilen Thrombinaktivität als Funktion der Zeit errechnet. Als Kalibrator dient ein α_2 -Macroglobulin-Thrombin-Komplex, da dieser Komplex inert gegenüber antikoagulatorischen Plasmaproteinen ist. Durch diesen Vergleich wird durch die Software das Fluoreszenzsignal der thrombinbildenden Probe in eine bestimmte Thrombinkonzentration umgerechnet.

Das Standardprotokoll der Thrombin-Messung wurde dahingehend geändert, dass eine Detektion unterschiedlicher TF-Konzentrationen möglich wurde. Bei der modifizierten Messung wurden 60 μ l einer TF-Quelle (Zellsuspensionen oder Zellüberstände) mit 20 μ l FluCa und 10 μ l einer Suspension mit Thrombozytenmembranen (vgl. 2.3.5) versetzt. In manchen Versuchen wurde auf den Zusatz der

Thrombozytenmembranen verzichtet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μ l platchenarmem Plasma (PPP) gestartet. Das Plasma wurde aus Vollblut gesunder Spender isoliert und durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 3000 x g von zellulären Bestandteilen befreit. Anschließend wurde das Plasma sterilfiltriert, um Mikropartikel zu entfernen. Die Lagerung erfolgte nach raschem Einfrieren in flüssigem Stickstoff aliquotiert bei -80 °C.

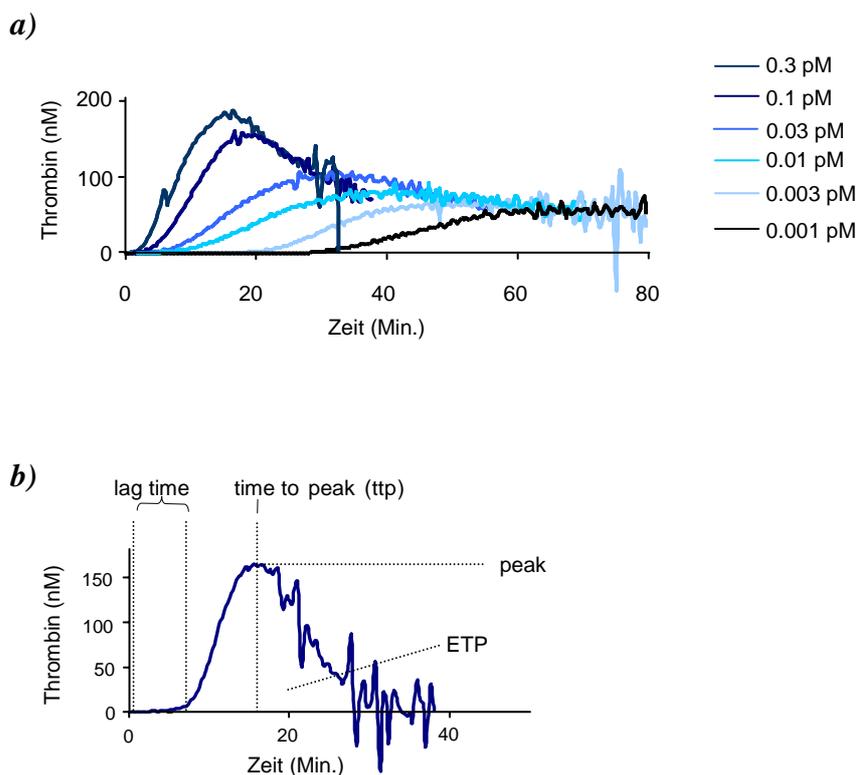


Abb. 3:

Messung des endogenen Thrombinpotentials (ETP), Originalkurven. **a)** Einfluss unterschiedlicher TF-Konzentrationen. **b)** Analyseparameter.

Abb. 3 zeigt den Einfluss unterschiedlicher TF-Konzentrationen auf die ETP-Kurven. Man kann bei dieser Methode vier Parameter auswerten: lag time, time to peak (ttp), peak und ETP. Das ETP ist die Fläche unter der Kurve und beschreibt die Kapazität des Plasmas, Thrombin zu bilden. Je größer der Wert für den Parameter ETP ist, desto explosiver verläuft die Blutgerinnungskaskade. Alle vier Parameter sind von der eingesetzten TF-Konzentration abhängig, am sensibelsten reagieren aber die drei Parameter lag time, ttp und peak auf unterschiedliche TF-Konzentrationen.

Vor den ETP-Messungen wurden glatte Gefamuskelnzellen für 24 h bzw. U937-Zellen für 12 h zuzüglich der jeweiligen Versuchsdauer in serumfreiem Kulturmedium inkubiert. U937-Zellen wurden vor der Messung kurz zentrifugiert (1000 x g, 45 s). Die Zellüberstände wurden in ein neues Gefäß überführt und anschließend 5 Min. bei 3000 x g zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Das

Zell-Pellet wurde wieder in dem Ausgangsvolumen des RPMI-Mediums resuspendiert. Die Dauer der Messungen lag zwischen 60 und 100 Min.

2.10 Perfusion von humanen glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen

Für die Perfusionsexperimente wurden HUVEC der Passagen 4 und 5 bzw. SMC der Passagen 4-13 auf Glasplättchen (24 x 60 mm) kultiviert.

Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen auf den Glasplättchen 1 x mit PBS gewaschen und danach in die Durchflusskammer eingesetzt. Die Scherrate γ wurde mit Hilfe der folgenden Formel berechnet:

$$\gamma = \frac{6 \cdot Q}{B \cdot h^2}$$

Q = Flussrate in cm³/s

B = Kammerbreite in cm

h = Höhe der Kammer in cm

γ = Scherrate in 1/s

Die Parallelflusskammer hatte in diesem Modell eine Breite von 1,54 cm.

Zur Perfusion der SMC wurde eine Flussrate von 2 ml/min gewählt, durch Variation der Kammerhöhe wurden verschiedene Scherraten erreicht (10-1500 s⁻¹). Bei den Versuchen zur Bestimmung des Einflusses der Scherrate und einzelner Substanzen auf die Freisetzung von Mikropartikeln wurden Fraktionen zu je 10 ml gesammelt, bei Messung des zeitlichen Verlaufs der Mikropartikel-Freisetzung wurden Fraktionen zu je 2 ml gesammelt.

Bei der Perfusion der HUVEC betrug die Flussrate 0,5 ml/min (0,0083 cm³/s), die Kammer war 1,54 cm breit und 0,016 cm hoch. Daraus ergab sich eine Scherrate von 125 s⁻¹. Die U937-Zellen wurden zur visuellen Kontrolle der Adhäsion an Endothelzellen vor Versuchsbeginn durch Inkubation mit Calcein-AM (3 μ M, 30 Min.) markiert. Calcein-AM ist ein nicht-fluoreszierender, zellpermeabler Ester, der durch Diffusion in das Zytoplasma von Zellen gelangt. Intrazellulär wird Calcein-AM durch Esterasen zum negativ geladenen, fluoreszierenden Calcein hydrolysiert, das in der Zelle verbleibt. Die Fluoreszenz wird bei 495 nm angeregt und hat ein Emissionsmaximum bei 517 nm. Die Adhäsion der U937-Zellen an Endothelzellen wurde fluoreszenzmikroskopisch detektiert (Mikroskop: IX50, Olympus, Hamburg).

2.11 Messung der P-Selectin Glycoprotein Ligand 1-Antikörperfluoreszenz im Zellüberstand

U937-Zellen wurden in 12-Loch-Platten für 12 h in serumfreiem Medium inkubiert. Die Zellsuspension wurde danach auf ein Zehntel des Ursprungsvolumens konzentriert (von 1000 µl auf 100 µl). Zu den verbleibenden 100 µl wurden 10 µl des PE-gekoppelten Anti-PSGL-1-Antikörpers pipettiert und 30 Min. bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden danach 3 x mit PBS gewaschen und in 500 µl serumfreiem RPMI-Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für 6 h mit oder ohne Zusatz von Staurosporin inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation entfernt (5 Min., 3000 x g) und die Fluoreszenz des Überstands bei 485 nm Exzitationswellenlänge und 580 nm Emissionwellenlänge gemessen (Shimadzu Spectrofluorophotometer RS-510).

2.12 Immunfluoreszenzmikroskopie

Für den immunhistochemischen Nachweis von PSGL-1 wurden U937-Zellen in serumfreiem RPMI Glutamax Medium mit 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin in NuncTM Lab-TekTM-Kammern überführt. Sofort danach wurde die Apoptose durch Staurosporin (2 µM) induziert. Nach 6 h Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem Methanol fixiert (15 Min.). Anschließend wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen und mit Anti-PSGL-1-Antikörper (556052, BD Pharmingen, Heidelberg) inkubiert (1 h bei RT; 1:500 in 3% BSA/PBS). Danach wurden die Zellen erneut 3 x gewaschen und mit einem Cy3-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper inkubiert (1 h bei RT; 1:600 in PBS). Die Kernfärbung erfolgte durch eine 2-minütige Inkubation mit dem Farbstoff Hoechst 33342 (1 µg/ml PBS) bei Raumtemperatur. Die Eindeckung der Zellen wurde mit „VECTASHIELD mounting medium“ (Vector, Axxora, Grünberg) durchgeführt.

Für den Nachweis von TF auf der Zelloberfläche von SMC wurden die Zellen für 20 Min. mit frisch hergestellter Paraformaldehyd-Lösung (3,7%) fixiert. Diese nicht-permeabilisierten SMC wurden 1 Stunde mit 3% Ziegen Serum präinkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit einem monoklonalen Anti-TF-Antikörper (MAB TFE280, Enzyme Research Laboratories, South Bend, USA; 1:100 in PBS/1% Ziegen Serum) für 1 h und mit einem Cy3-gekoppelten Sekundär-Antikörper (1:200 in PBS) für 1 h. Die Zellen wurden zwischen den Inkubationen mit PBS gewaschen, Zellkerne wurden mit Hoechst 33324 gefärbt (s.o.). Die Detektion erfolgte mit einem Olympus-BX70-Mikroskop.

2.13 Kernfragmentierung

U937-Zellen bzw. SMC wurden mit eiskaltem Methanol 5 Min. fixiert und anschließend an der Luft getrocknet. Die Kernfärbung erfolgte durch eine 5-minütige Inkubation mit dem Farbstoff Hoechst 33342 (2 µg/ml PBS). Nach 3-fachem Waschen mit PBS wurden die Zellen mikroskopiert (Mikroskop: BX70, Olympus, Hamburg).

2.14 Statistik

Die Messdaten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus n unabhängigen Experimenten angegeben. Das Signifikanzniveau P für α wurde mit 0,05 festgelegt. Signifikante Unterschiede zwischen mehreren Versuchsgruppen (≥ 3) wurden mittels One-Way Analysis of Variance (ANOVA) und nachfolgendem Bonferroni-Test für multiple Vergleiche überprüft. Unterschiede zwischen zwei Versuchsgruppen wurden mittels ungepaartem oder gepaartem „Student's t-Test“ überprüft. Lineare Zusammenhänge einer metrischen abhängigen Variablen y von einer metrischen unabhängigen Variablen x wurden mittels linearer Regression bestimmt. Die Güte der Regression wurde anhand des Bestimmtheitsmaßes r^2 bewertet. Das Konfidenzintervall für den vorhergesagten Wert y wurde mit 95% festgelegt. Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte mit GraphPad Prism-Software (Version 4.00, GraphPad Software, San Diego, USA) oder Microsoft ExcelTM (Microsoft GmbH, Frankfurt).

3 Ergebnisse

3.1 Freisetzung von Tissue Factor aus humanen arteriellen glatten Gefäßmuskelzellen

3.1.1 Freisetzung von Tissue Factor aus humanen glatten Gefäßmuskelzellen unter statischen Bedingungen

Die Freisetzung von TF-haltigen Mikropartikeln stellt eine konstitutive Eigenschaft humaner SMC der Aorta dar. In der Arbeit von Schechter et al. (2000) akkumulierte TF langsam im Zellüberstand. In Vorversuchen wurde untersucht, ob diese Beobachtung mit humanen SMC der Arteria mammaria reproduziert werden konnte. Zu diesem Zweck wurden die SMC nach einem 24-stündigen Serumentzug mit frischem, serumfreiem Inkubationsmedium versetzt. Zu den angezeigten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die prokoagulatorische Aktivität dieser Fraktionen durch Messung des endogenen Thrombinpotentials bestimmt.

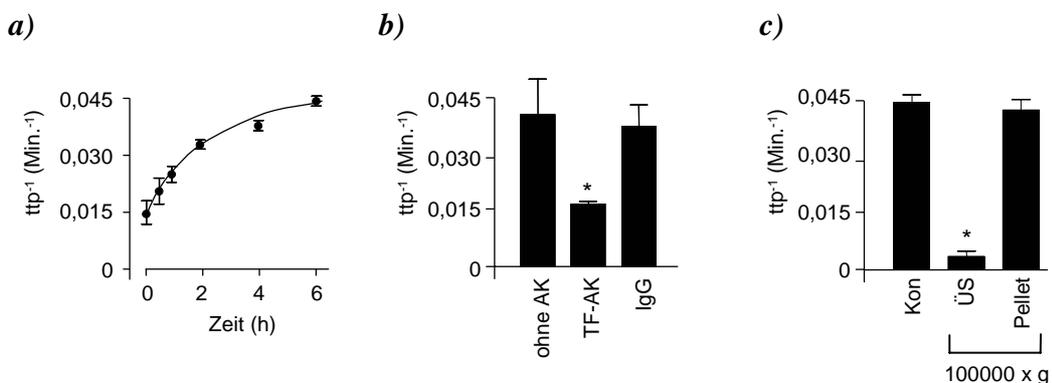


Abb. 4:

TF-Freisetzung aus humanen SMC unter statischen Bedingungen. **a)** Prokoagulatorische Aktivität im Zellüberstand. **b)** Einfluss TF-inhibierender Antikörper (10 µg/ml, 1 h) auf die prokoagulatorische Aktivität des Zellüberstandes zum Zeitpunkt $t = 6$ h. **c)** Einfluss einer Ultrazentrifugation (100000 x g, 1 h) auf die prokoagulatorische Aktivität des Zellüberstandes (Kon), des Ultrazentrifugationsüberstandes (ÜS) und des Ultrazentrifugationsrückstandes (Pellet). Quantitative Auswertung aus $n = 6$ Experimenten. *, $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Abb. 4 zeigt die Freisetzung von prokoagulatorischer Aktivität in den Zellüberstand unter statischen Bedingungen. Zu Beginn der Inkubation konnte nur wenig Aktivität im Überstand gemessen werden. Im Verlauf von 6 Stunden kam es zu einem deutlichen Anstieg der prokoagulatorischen Aktivität (Abb. 4 a). Der Zellüberstand wurde nach 6 Stunden Inkubation mit TF-inhibierenden Antikörpern inkubiert. Durch die Inhibierung von TF konnte die prokoagulatorische Aktivität auf das initiale Niveau ($t_{tp}^{-1} = 0,015 \text{ Min.}^{-1}$ zum Zeitpunkt $t = 0$) gesenkt werden (Abb. 4 b). Kontroll-Immunglobuline hingegen hatten keinen Einfluss auf die Thrombogenität. Das bedeutet, dass die prokoagulatorische Aktivität des Zellüberstandes auf TF zurückzuführen war. In einem weiteren Versuch wurde überprüft, ob TF im Zellüberstand in einer löslichen Form oder in einer Mikropartikel-gebundenen Form vorlag. Dazu wurde eine Ultrazentrifugation durchgeführt und die prokoagulatorische Aktivität des Zellüberstandes, des Ultrazentrifugationsüberstandes und des Ultrazentrifugationspellets bestimmt. Das Ultrazentrifugationspellet wurde vor der Messung der prokoagulatorischen Aktivität in frischem DMEM resuspendiert. Das Volumen zur Resuspension entsprach dem gleichen Volumen des Zellüberstandes, das ultrazentrifugiert wurde. Die prokoagulatorische Aktivität des Zellüberstandes wurde durch Ultrazentrifugation nahezu vollständig gesenkt (Abb. 4 c). Das resuspendierte Ultrazentrifugationspellet wies die gleiche prokoagulatorische Aktivität wie der Zellüberstand auf. Das bedeutet, dass TF im Zellüberstand in einer Mikropartikel-gebundenen Form vorlag.

Die Ergebnisse zeigten, dass der Befund von Schechter et al. (2000) auch mit SMC der Arteria mammaria reproduzierbar war und diese Zellen daher als Zellsystem geeignet waren, um die Freisetzung von TF unter Flussbedingungen zu untersuchen.

3.1.2 Freisetzung von Tissue Factor aus humanen glatten Gefäßmuskelzellen unter Flussbedingungen

Zunächst sollte die Freisetzung von TF unter Flussbedingungen mit der Freisetzung von TF unter statischen Bedingungen verglichen werden.

Abb. 5 a zeigt die prokoagulatorische Aktivität des Perfusats nach einer 5-minütigen Perfusion bei einer mittleren Scherrate von 500 s^{-1} im Vergleich zu der prokoagulatorischen Aktivität nach einer gleich langen Inkubation derselben Zellen unter statischen Bedingungen. Die Einwirkung von Scherkräften führte zu einem starken Anstieg der prokoagulatorischen Aktivität. Die dabei gemessene prokoagulatorische Aktivität war an Mikropartikel gebunden, weil nach einer Ultrazentrifugation die gesamte prokoagulatorische Aktivität im Zentrifugationspellet zu finden war und der Zentrifugationsüberstand keine Aktivität mehr aufwies (Abb. 5 b,c). Die Freisetzung der prokoagulatorischen Mikropartikel korrelierte mit der Scherrate: bei Scherraten, wie sie im venösen System vorliegen ($10 \text{ s}^{-1} - 100 \text{ s}^{-1}$), war die Freisetzung gering und bei Scherraten, wie sie im arteriellen System vorliegen ($1000 \text{ s}^{-1} - 1500 \text{ s}^{-1}$), hoch (Abb. 5 d).

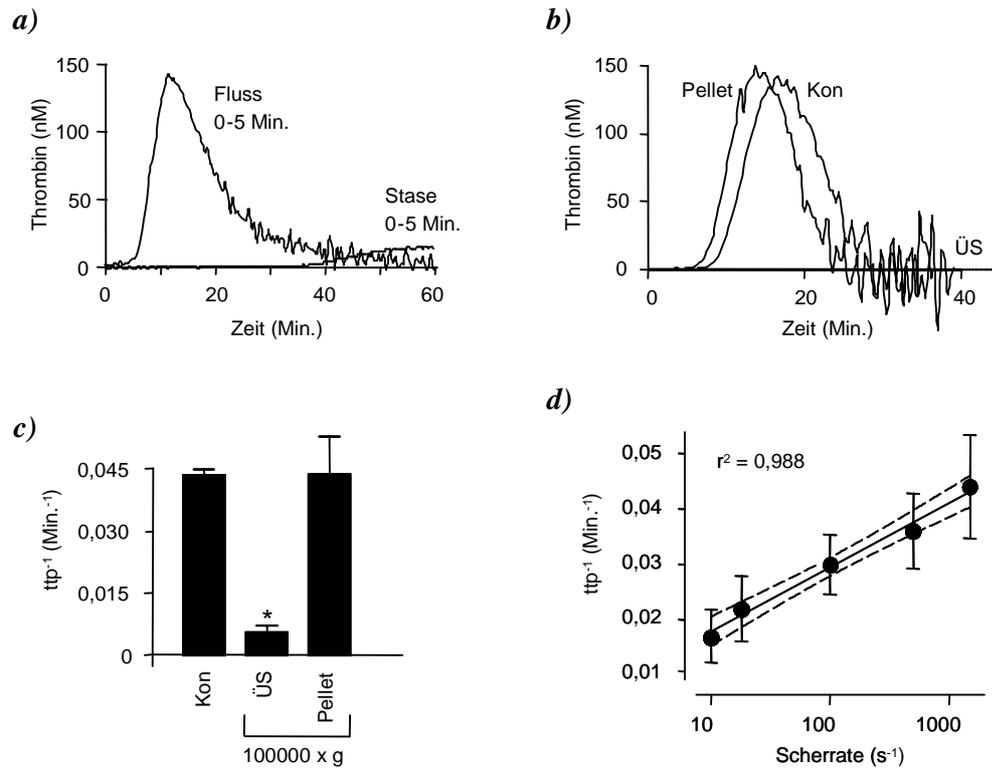


Abb. 5:

Effekt von Fluss auf die Freisetzung prokoagulatorischer Mikropartikel aus SMC. **a)** Vergleich der Thrombogenität des Perfusats nach einer 5-minütigen Perfusion (Fluss, 500 s⁻¹) mit der Thrombogenität des Zellüberstandes nach 5 Min. unter statischen Bedingungen (Stase). **b), c)** Effekt einer Ultrazentrifugation (100000 x g, 1 h) auf die Thrombogenität des Perfusates. Kon = Zellüberstand, Pellet = Ultrazentrifugationsrückstand, ÜS = Ultrazentrifugationsüberstand (keine prokoagulatorische Aktivität, parallel zur x-Achse). **d)** Einfluss der Scherrate auf die Freisetzung prokoagulatorischer Mikropartikel. Lineare Regression (durchgezogene Linie) und 95% Konfidenzintervall (gestrichelte Linien). Repräsentative Originalmessungen und quantitative Auswertungen aus n = 6 Experimenten. *, p < 0,05 vs. Kontrolle.

In den nachfolgenden Versuchen wurde überprüft, ob die prokoagulatorische Aktivität auf TF zurückzuführen war. Abb. 6 a zeigt eine Western-Blot-Analyse von Zelllysaten und deren korrespondierenden Mikropartikeln, die durch Ultrazentrifugation (100000 x g, 1 h) aus Perfusaten isoliert wurden.

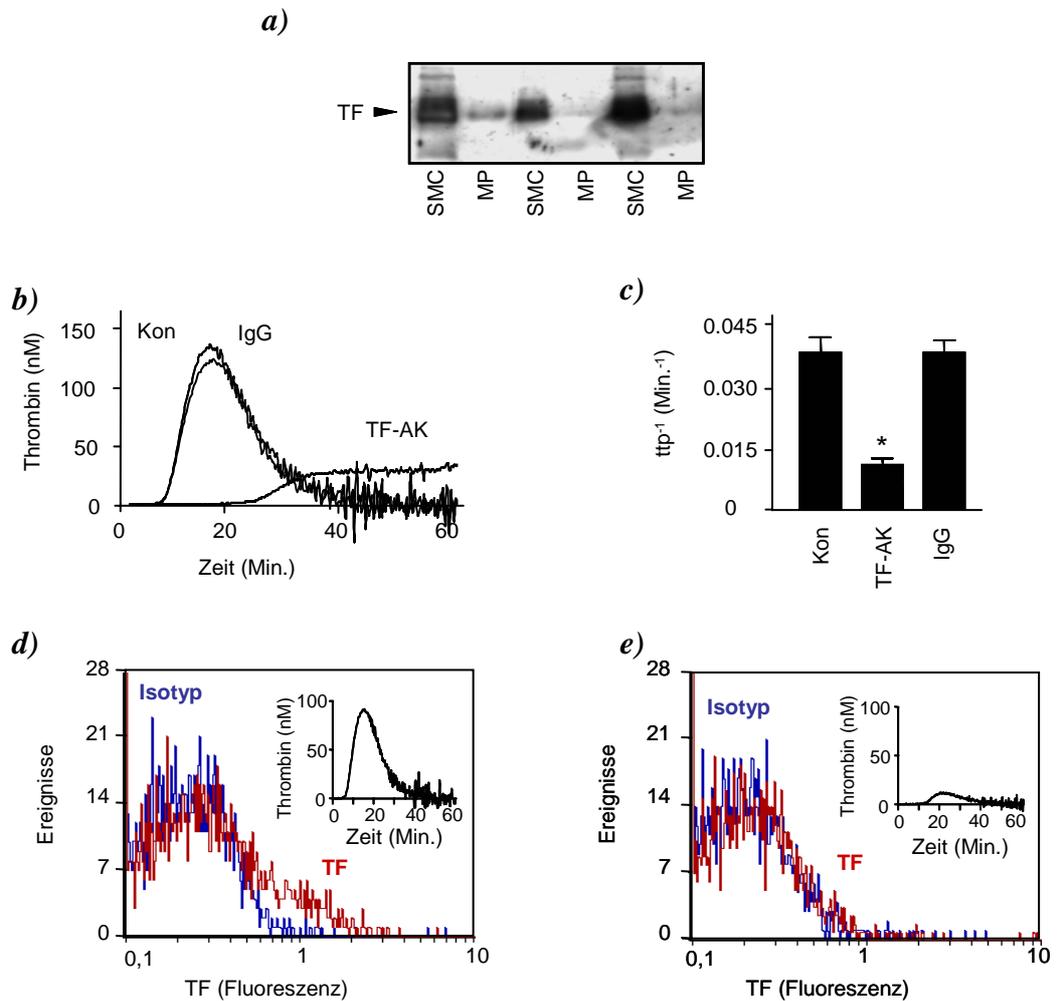


Abb. 6:

Identifizierung von TF. **a)** Western-Blot, TF-Nachweis in Zelllysaten (SMC) und in Mikropartikeln (MP) aus Perfusaten, $n = 3$. **b), c)** Einfluss TF-inhibierender Antikörper auf die Thrombogenität des Perfusates, repräsentative Originalmessung und quantitative Auswertung aus $n = 6$ Experimenten. *, $p < 0,05$ vs. Kontrolle. **d), e)** Durchflusszytometrische Analyse einer Perfusat-Fraktion mit **d)** hoher und **e)** niedriger prokoagulatorischer Aktivität. Repräsentative Originalhistogramme und Originalmessungen aus $n = 3$ Experimenten.

In der Mikropartikelfraktion konnte TF als ca. 47 kD großes Protein nachgewiesen werden. Der Einfluss von TF auf die prokoagulatorische Aktivität wurde durch TF-inhibierende Antikörper überprüft (Abb. 6 b,c). Die prokoagulatorische Aktivität wurde durch die Antikörper signifikant gesenkt. Zur Kontrolle wurden die Zellüberstände über den gleichen Zeitraum mit Kontroll-Immunglobulinen inkubiert, um eine unspezifische Inhibierung von TF auszuschliessen. Die Kontroll-Immunglobuline hatten keinen Einfluss auf die

prokoagulatorische Aktivität des Zellüberstandes. Das bedeutet, dass die prokoagulatorische Aktivität auf TF zurückzuführen war. Der Nachweis von TF auf Mikropartikeln erfolgte außerdem mittels Durchflusszytomtrie (Abb. 6 d,e). In einer Perfusionsfraktion mit einer hohen prokoagulatorischen Aktivität konnte TF auf Mikropartikeln nachgewiesen werden, während in Fraktionen mit einer niedrigen prokoagulatorischen Aktivität kein TF detektiert werden konnte.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Freisetzung von TF während einer längeren Perfusion (40 Min.) untersucht. In den Originalkurven war eine schnell abnehmende prokoagulatorische Aktivität zu erkennen. Die Fraktionen, die zu Beginn der Perfusion gesammelt wurden, wiesen eine starke prokoagulatorische Aktivität auf. Die Perfusatfraktionen, die nach einer Perfusionsdauer von ca. 7 Min. gesammelt wurden, wiesen nur noch eine minimale prokoagulatorische Aktivität auf (Abb. 7 a). Nach etwa 10 Min. wurde eine Talphase erreicht, die auch bei einer weiteren Perfusion der Zellen nicht wieder anstieg (Abb. 7 b).

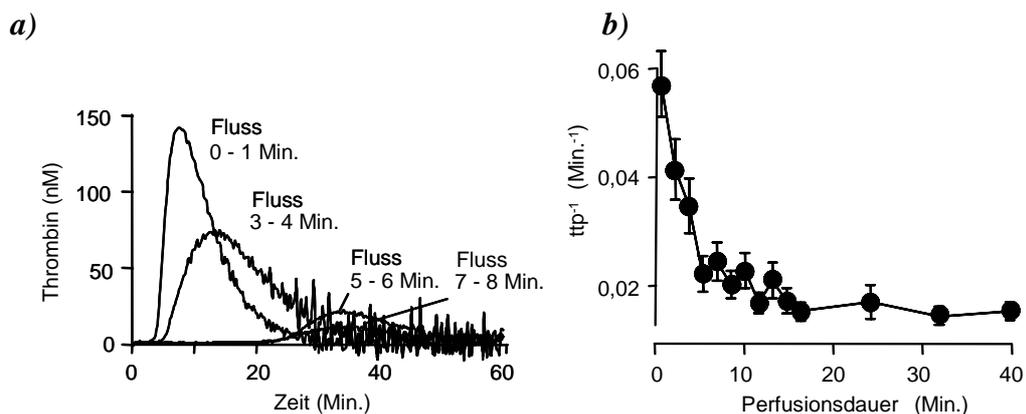


Abb. 7: Zeitverlauf der TF-Freisetzung unter Flussbedingungen (500 s^{-1}). *a)* Originalmessungen. *b)* Auswertung aus $n = 6$ Experimenten.

Daher wurde anschließend überprüft, ob weiterhin TF-Protein nach einer 15-minütigen Perfusion auf der Zelloberfläche nachzuweisen war oder ob der gesamte Zelloberflächen-TF in das Perfusat gespült wurde. Zur Bestimmung der TF-Expression auf der Zelloberfläche wurden nicht-permeabilisierte Zellen (Fixierung der Zellen durch Paraformaldehyd) immunhistochemisch untersucht. Auf nicht-perfundierten Zellen konnte TF immunhistochemisch nachgewiesen werden (Abb. 8 a). Die rote Färbung zeigte TF an. Zellkerne waren blau markiert. Interessanterweise konnte auch eine positive TF-Färbung auf Zellen, die 15 Min. lang perfundiert wurden, gezeigt werden (Abb. 8 b). Das gleiche Färbungsmuster wurde auch bei Zellen beobachtet, die nach der Perfusion unter statischen Bedingungen für 60 Min. inkubiert wurden (Abb. 8 c).

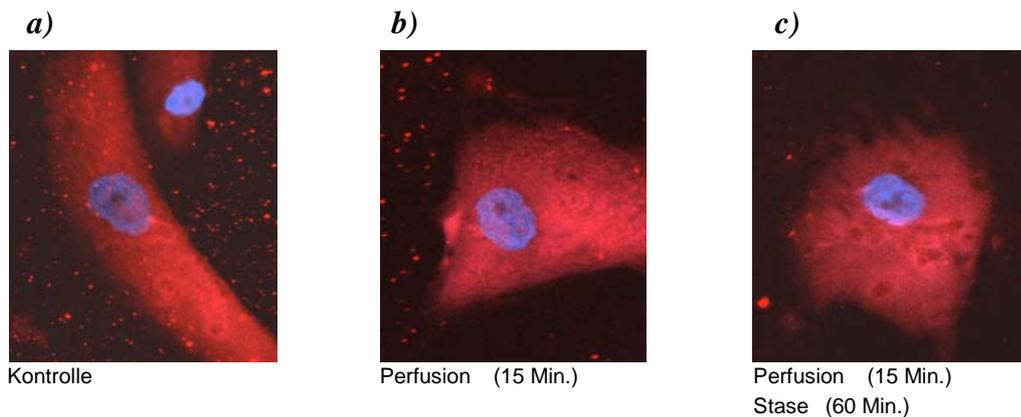


Abb. 8:

Immunhistochemischer Nachweis von TF auf der Zelloberfläche nicht-permeabilisierter Zellen (rot = TF, blau = Zellkern). **a)** Nicht-perfundierte Zellen. **b)** Zellen nach einer 15-minütigen Perfusion. **c)** Zellen nach einer 15-minütigen Perfusion und anschließender statischer Phase von 60 Min. Repräsentative Darstellung von n = 3 Experimenten.

Da TF offensichtlich weiterhin auf der Zelloberfläche exprimiert wurde, sollte in anschließenden Versuchen geklärt werden, ob es zu einer Reexposition von freisetzbarem TF kommt. Dazu wurden SMC zunächst bis zum Erreichen der Talphase (15 Min.) perfundiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation über verschiedene Zeiträume unter statischen Bedingungen.

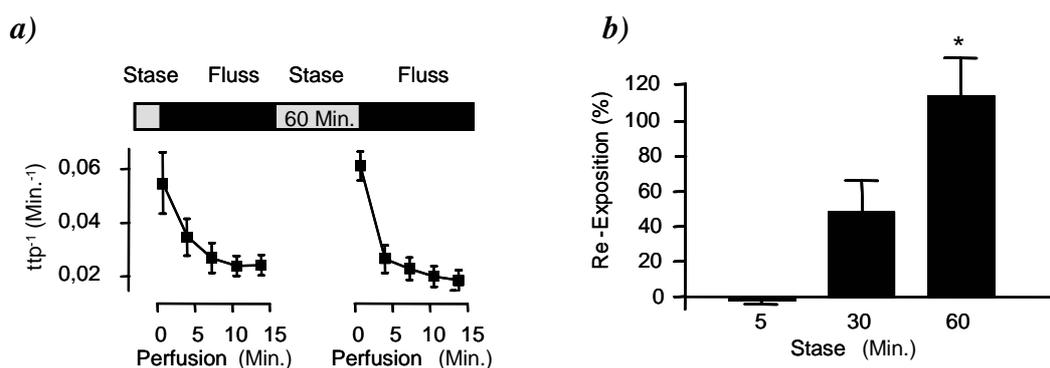


Abb. 9:

Re-Exposition von freisetzbarem TF nach Flussunterbrechung. **a)** Kinetik zweier aufeinanderfolgender Perfusionen mit angegebener Flussunterbrechung. **b)** Einfluss der Dauer der Flussunterbrechung auf die Reexposition von freisetzbarem TF. Quantitative Auswertungen aus n = 6 Experimenten. *, $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Nach dieser Flussunterbrechung wurden die Zellen ein zweites Mal perfundiert. Bei einer Flussunterbrechung von 60 Min. kam es zu einer signifikanten Reexposition von freisetzbarem TF (Abb. 9 a,b). Die initialen Werte der ersten Perfusion wurden wieder erreicht. Ähnlich wie bei der ersten Perfusion wurde TF bei der zweiten Perfusion schnell, jedoch transient in das Perfusat freigesetzt.

Da bekannt ist, dass bei der klassischen Mikropartikelfreisetzung die Cysteineprotease Calpain und die intrazelluläre Ca^{++} -Konzentration eine wichtige Rolle spielen (Zwaal & Schroit, 1997), wurden die Zellen in Kontrollversuchen mit einem Calpain-Inhibitor (ALLN, Calpain Inhibitor I, 100 μ M) und einem Chelator intrazellulärer Ca^{++} -Ionen (BAPTA-AM, 30 μ M) perfundiert. Der Einfluss der Zellaktivierung wurde durch Perfusion der Zellen mit Iloprost (Ilomedin, 100 nM) untersucht. Bei diesen Versuchen wurden die Zellen in einer ersten Perfusion in Anwesenheit des jeweiligen Inhibitors 15 Min. bis zum Erreichen der Talphase perfundiert und danach in dem Inhibitor-haltigen Medium für 60 Min. unter statischen Bedingungen inkubiert. Anschließend erfolgte wieder eine 10-minütige Reperfusion. Keiner der Inhibitoren konnte die Reexposition von freisetzbarem TF verhindern (Abb. 10). In Gegenwart des Ca^{++} -Chelators BAPTA kam es nicht zu einer signifikanten Reexposition von TF. Allerdings war auch hier die Thrombogenität des Perfusats bei der Reperfusion deutlich stärker als gegen Ende der ersten Perfusion, so dass ein Einfluss der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration auf die Reexposition von freisetzbarem TF unwahrscheinlich war.

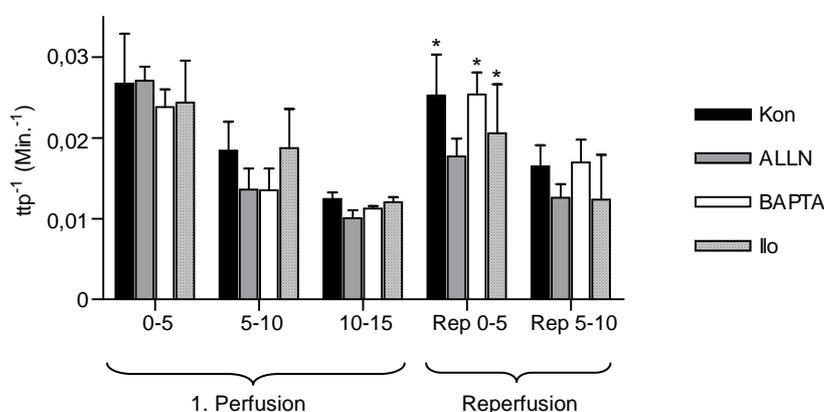


Abb. 10:

Pharmakologische Beeinflussung der Reexposition von freisetzbarem TF mit Calpain-Inhibitor I (ALLN, 100 μ M), BAPTA-AM (BAPTA, 30 μ M) und Iloprost (Ilo, 100 nM). x-Achse: 1. Perfusion (Min.) und Reperfusion (Rep, Min.). Quantitative Auswertung aus n = 4 Experimenten. *, p < 0,05 vs. 1. Perfusion (10-15).

3.2 Freisetzung von Tissue Factor aus apoptotischen Zellen

Da bekannt ist, dass im Bereich von atherosklerotischen Plaques Apoptose in verschiedenen Zelltypen, insbesondere SMC und Makrophagen, nachgewiesen werden kann und Apoptose ein sehr wichtiger Mechanismus zur Freisetzung von Mikropartikeln ist, sollte der Einfluss der Apoptose auf die Thrombogenität der freigesetzten Mikropartikel aus SMC und der monozytären Zelllinie U937 untersucht werden.

3.2.1 Freisetzung von Tissue Factor aus apoptotischen humanen glatten Gefäßmuskelzellen

Die Apoptose in SMC wurde durch den Proteinkinase C (PKC)-Inhibitor Staurosporin (2 μ M) induziert. Nach Induktion der Apoptose wurden die Zellen für 24 h inkubiert, um eine adäquate Akkumulation von Mikropartikeln zu gewährleisten.

Die für apoptotische Zellen typische Kernfragmentierung wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen, die ebenfalls typische Spaltung der Caspase-3 mittels Western-Blot (Abb. 11).

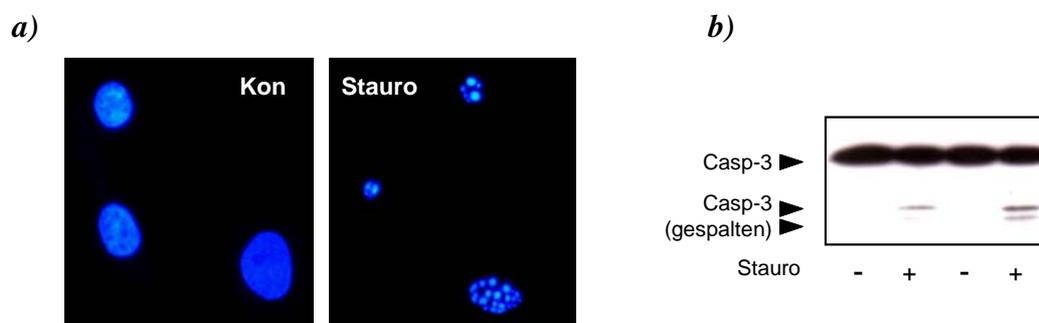


Abb. 11:

Nachweis der Staurosporin (Stauro, 2 μ M, 24 h)-induzierten Apoptose arterieller SMC durch *a*) Kernfragmentierung und *b*) Caspase-3 (Casp-3)-Spaltung. Repräsentative Abbildungen für n = 3 Experimente.

Da die Thrombogenität der Mikropartikel untersucht werden sollte, wurden die Mikropartikel apoptotischer und nicht-apoptotischer Zellen 24 h nach Induktion der Apoptose durch Ultrazentrifugation (100000 x g, 1 h) pelletiert und zunächst mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Die densitometrische Auswertung der

Western-Blots ergab, dass sich in den Mikropartikeln apoptotischer Zellen etwa doppelt soviel TF befand wie in denen nicht-apoptotischer Zellen (Abb. 12 a,b). Zur Quantifizierung der freigesetzten Mikropartikel wurde eine Proteinbestimmung des Ultrazentrifugationspellets durchgeführt.

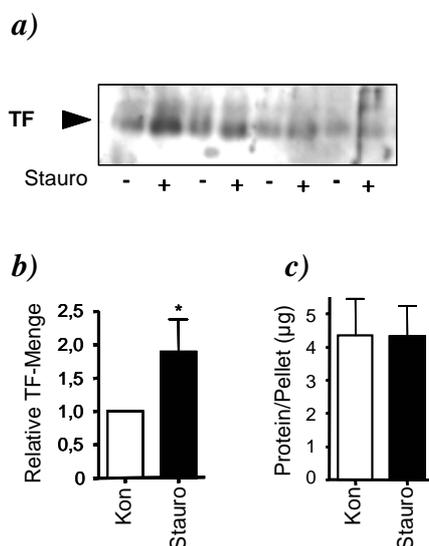


Abb. 12:

a) Western-Blot apoptotischer und nicht-apoptotischer Mikropartikel aus SMC. **b), c)** Charakterisierung der Mikropartikel hinsichtlich TF- und Gesamtproteingehalt. Die Apoptose wurde durch Staurosporin (Stauro, 2 µM, 24 h) induziert. Kontrolle = Kon. Abbildung und quantitative Auswertung aus n = 4 Experimenten. *, p < 0,05 vs. Kontrolle.

Obwohl sich der TF-Gehalt der Mikropartikel unterschied, waren keine Unterschiede im Proteingehalt der freigesetzten Mikropartikel zu finden. Offensichtlich wurden bei Apoptose gleich viele Mikropartikel sezerniert wie unter Kontrollbedingungen. Die bei der Apoptose sezernierten Mikropartikel unterschieden sich aber hinsichtlich ihres TF-Gehaltes von den Mikropartikeln, die unter Kontrollbedingungen sezerniert wurden.

Die funktionellen Konsequenzen der Apoptose auf die Thrombogenität der Mikropartikel wurden durch ETP-Messungen bestimmt.

Bei diesen Messungen wurden die Mikropartikel in zwei verschiedenen Versuchsansätzen bestimmt: im ersten Ansatz wurde die prokoagulatorische Aktivität der Mikropartikel mit Zusatz von Thrombozytenmembranen gemessen. Im zweiten Versuchsansatz wurde die prokoagulatorische Aktivität der Mikropartikel ohne den Zusatz von Thrombozytenmembranen gemessen. *In vivo* stellt die Oberfläche aktivierter Thrombozyten die wichtigste Quelle für negativ geladene Phospholipide dar. Dieser Versuchsaufbau sollte Aufschluss darüber geben, inwiefern die sezernierten Mikropartikel unabhängig von zusätzlichen negativ geladenen Membranoberflächen die Thrombinbildung initiieren und

propagieren können. In Abb. 13 a sind die Messungen mit Zusatz von Thrombozytenmembranen dargestellt. Die Mikropartikel der apoptotischen Zellen führten zu einer signifikant stärkeren Thrombinbildung als die Mikropartikel der Kontrollzellen. Alle vier Parameter der ETP-Messung waren signifikant erhöht. Noch deutlicher wurde der funktionelle Unterschied bei der ETP-Messung ohne Zusatz von Thrombozytenmembranen (Abb. 13 b).

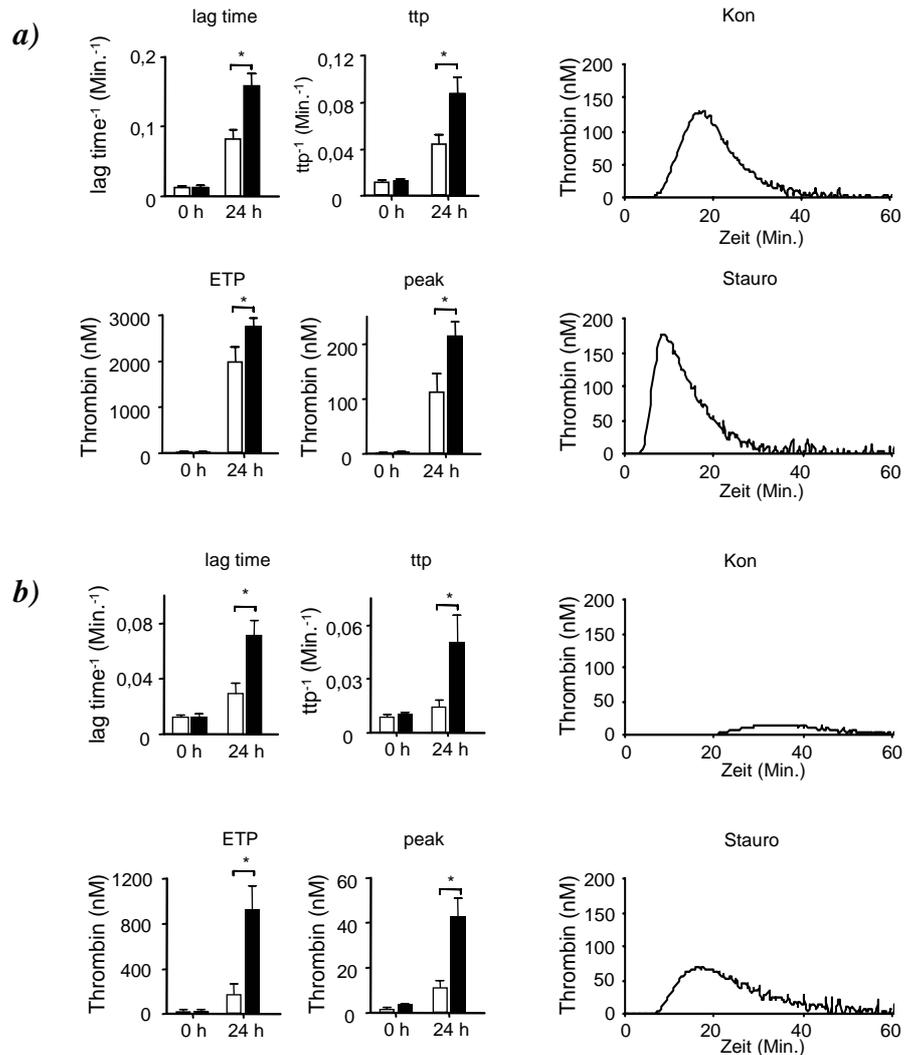


Abb. 13:

Thrombogenitätsbestimmung von Mikropartikeln aus SMC durch ETP-Messung. **a)** mit Zusatz von Thrombozytenmembranen bzw. **b)** ohne Zusatz von Thrombozytenmembranen. Weiße Balken = Kontrolle (Kon), schwarze Balken = apoptotische (Stauro) Mikropartikel. Die Apoptose wurde durch Staurosporin (Stauro, 2 μ M, 24 h) induziert. Kontrolle = Kon. Repräsentative Originalmessungen und quantitative Auswertung aus n = 4 Experimenten. *, p < 0,05 vs. Kontrolle.

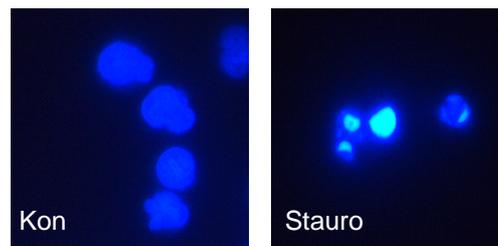
Bei allen vier Parametern bestanden signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und der mit Staurosporin-behandelten Probe. Die Originalabbildungen verdeutlichen den Unterschied hinsichtlich der prokoagulatorischen Aktivität zwischen apoptotischen und nicht-apoptotischen Mikropartikeln. Die Mikropartikel der Kontrollzellen haben in Abwesenheit zusätzlicher negativ geladener Phospholipide nur eine minimale Thrombinbildung induziert, während die Mikropartikel apoptotischer Zellen zu einer starken Thrombinbildung führten.

In einem zweiten Zellsystem sollte getestet werden, ob der beobachtete Effekt Zelltyp-spezifisch für SMC ist oder ob auch in anderen Zellen ein funktioneller Unterschied zwischen apoptotischen und nicht-apoptotischen Mikropartikeln besteht. Als wichtigste Quelle für zirkulierenden TF werden Monozyten diskutiert, daher wurde die monozytäre Zelllinie U937 als zweites Zellsystem herangezogen.

3.2.2 Freisetzung von Tissue Factor aus apoptotischen U937-Zellen

Die Apoptose in U937-Zellen wurde durch Zugabe von Staurosporin (2 μ M) induziert und mittels Kernfragmentierung und Spaltung der Caspase-3 (Abb. 14 a,b) nachgewiesen.

a)



b)

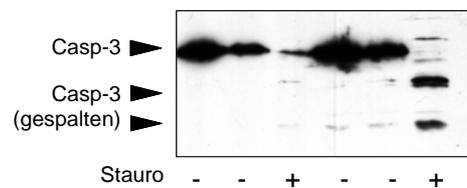


Abb. 14:

Apoptose von U937-Zellen. Nachweis der Apoptose durch *a)* Kernfragmentierung, *b)* Caspase-3 (Casp-3)-Western-Blot. Die Apoptose wurde durch Staurosporin (Stauro, 2 μ M, 24 h) induziert. Kontrolle = Kon. Repräsentative Abbildungen aus n = 4 Experimenten.

Die Thrombogenität der freigesetzten Mikropartikel wurde durch Messung des ETP bestimmt. Ähnlich wie bei der Messung der Mikropartikel aus SMC war die Thrombogenität der aus apoptotischen Zellen stammenden Mikropartikel signifikant erhöht im Vergleich zu den Mikropartikeln aus Kontrollzellen.

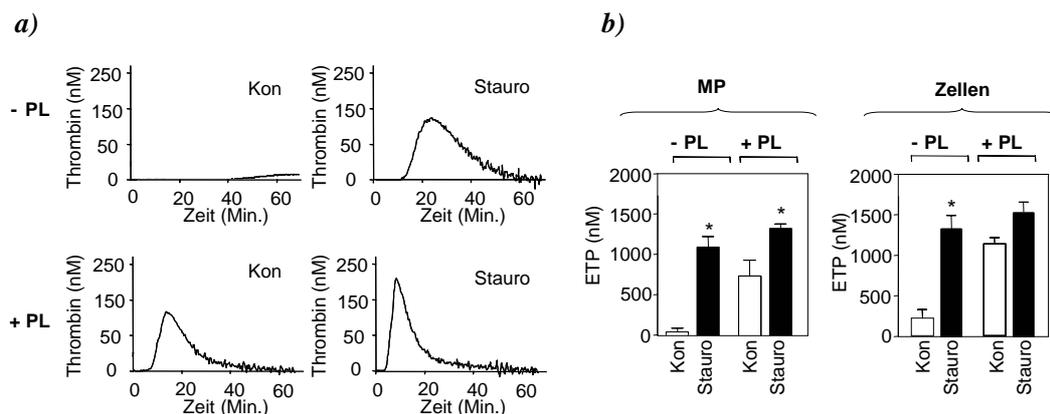


Abb. 15:

Thrombogenität apoptotischer und nicht-apoptotischer U937-Zellen (Zellen) und korrespondierender Mikropartikel (MP). **a)** ETP-Messungen mit Mikropartikeln in Abwesenheit (- PL) oder Gegenwart (+ PL) zusätzlicher negativ geladener Phospholipide. **b)** Statistische Auswertung der Thrombogenität der Zellen und Mikropartikel, dargestellt als ETP. Repräsentative Originalmessungen und quantitative Auswertung aus $n = 6$ Experimenten. Die Apoptose wurde durch Staurosporin (Stauro, $2 \mu\text{M}$, 24 h) induziert. Kontrolle = Kon. *, $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Abb. 15 zeigt die Originalabbildungen der ETP-Messungen mit Mikropartikeln sowie die statistische Auswertung der ETP-Messungen mit Mikropartikeln und Zellen. Ohne den Zusatz von Thrombozytenmembranen kam es bei den Mikropartikeln aus Kontrollzellen nur zu einer sehr schwachen Thrombinbildung (Abb. 15 a, oben, Kon). Die Mikropartikel, die aus den Zellüberständen apoptotischer Zellen isoliert wurden, führten ohne den Zusatz von Thrombozytenmembranen zu einer starken Thrombinbildung (Abb. 15 a, oben, Stauro). Durch den Zusatz von Thrombozytenmembranen wurde die prokoagulatorische Aktivität der Mikropartikel aus Kontrollzellen stark erhöht (Abb. 15 a, unten). Die prokoagulatorische Aktivität der Mikropartikel aus apoptotischen Zellen wurde unter diesen Bedingungen nur schwach gesteigert. Die statistische Auswertung dieser Versuchsansätze zeigte eine signifikante Erhöhung der prokoagulatorischen Aktivität apoptotischer Mikropartikel im Vergleich zu nicht-apoptotischen Mikropartikeln sowohl bei der ETP-Messung ohne Zusatz von negativ geladenen Phospholipiden als auch mit Zusatz von negativ geladenen Phospholipiden. Bei der ETP-Messung mit Zellen wurden ähnliche Ergebnisse beobachtet: in Abwesenheit von zusätzlichen negativ geladenen Phospholipiden vermochten Kontrollzellen nur eine schwache Thrombinbildung auszulösen, apoptotische Zellen führten unter diesen Bedingungen zu einer starken Thrombinbildung. Durch den Zusatz von negativ geladenen Phospholipiden wurde der Unterschied zwischen nicht-apoptotischen und apoptotischen Zellen hinsichtlich der Thrombogenität aufgehoben (Abb. 15 b).

Zellaktivierung und Apoptose sind die wichtigsten Mechanismen zur Freisetzung von Mikropartikeln. Da in den vorangegangenen Versuchen gezeigt wurde, dass die Apoptose zu einer erhöhten prokoagulatorischen Aktivität führt, wurde der Einfluss der Zellaktivierung auf die Thrombogenität der Mikropartikel untersucht. Als Stimulus zur Zellaktivierung wurde Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA, 100 nM) verwendet.

Die Zellaktivierung führte zu einer schwachen, statistisch jedoch nicht signifikanten Erhöhung der Thrombogenität der Mikropartikel (Abb. 16). Aus diesem Grund wurden in den nachfolgenden Versuchen nur Mikropartikel aus unstimulierten Zellen mit denen aus apoptotischen Zellen verglichen.

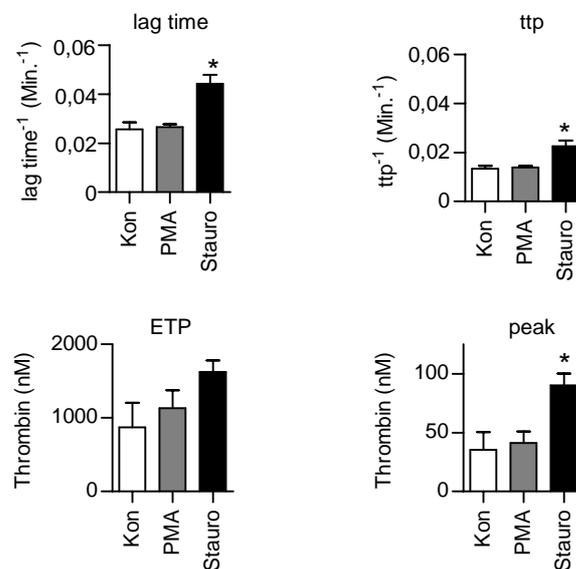


Abb. 16:

Thrombogenität der Zellüberstände von unstimulierten (Kon, 24 h), PMA (PMA, 100 nM, 24 h)-aktivierten und apoptotischen (Stauro, 2 μ M, 24 h) Zellen. Quantitative Auswertung aus n = 6 Experimenten. *, p < 0,05 vs. Kontrolle.

Es ist bekannt, dass die Expression von negativ geladenen Phospholipiden (z.B. Phosphatidylserin und -ethanolamin) auf der Zelloberfläche zu einer Aktivierung von TF führt (Kunzelmann-Marche et al., 2000). Die Expression negativ geladener Phospholipide kann durch die Bindung von Annexin-V gemessen werden. Daher wurden Zellen und Mikropartikel durchflusszytometrisch hinsichtlich der Expression von TF und der Bindung von Annexin-V analysiert. Abb. 17 zeigt die Streulichtabbildungen der durchflusszytometrischen Messungen. In der linken Spalte sind die Streulichteigenschaften von Zellen (schmales Rechteck) und Mikropartikeln (breites Rechteck) nicht-apoptotischer und apoptotischer Zellen dargestellt. Die Abbildungen in der Mitte und rechts zeigen die

Fluoreszenz von Zellen und Mikropartikeln. CD45 ist ein Protein, das auf der Oberfläche aller Leukozyten exprimiert wird. Da Mikropartikel Membranabschnürungen darstellen, wurden die Mikropartikel als CD45-positives Ereignis definiert. Aus diesem Grund wurde eine Doppelfärbung von Zellen und Mikropartikeln mit einem FITC-markierten Anti-TF-Antikörper und einem PE-gekoppelten Anti-CD45-Antikörper durchgeführt.

Im gelben Feld befinden sich CD45-positive Ereignisse. Im gelb schraffierten Feld befinden sich Ereignisse, die sowohl TF-positiv als auch CD45-positiv sind. Bei den Kontrollzellen konnten nur wenige TF-positive Ereignisse beobachtet werden (Abb. 17 a,b). Bei den apoptotischen Zellen wurde TF auf etwa der Hälfte aller Zellen nachgewiesen (Abb. 17 a,b). Hinsichtlich der Expression von TF bestand ein signifikanter Unterschied zwischen nicht-apoptotischen und apoptotischen Zellen. Nach der Inkubation der Zellen mit PE-gekoppeltem Annexin-V konnten bei den apoptotischen Zellen signifikant mehr Annexin-V-positive Ereignisse beobachtet werden als bei nicht-apoptotischen Zellen (Abb. 17 b). Bei der Analyse der Mikropartikel wurden auf apoptotischen und nicht-apoptotischen Mikropartikeln etwa gleich viele TF-positive Ereignisse registriert (Abb. 17 a,b). Hinsichtlich der Expression negativ geladener Phospholipide bestanden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen nicht-apoptotischen und apoptotischen Mikropartikeln. Die Anzahl der Mikropartikel (dargestellt als Mikropartikel pro 100 Zellen) wurde durch Induktion der Apoptose im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen leicht erhöht. Der Unterschied in der Anzahl der Mikropartikel war jedoch statistisch nicht signifikant. In Kontrollversuchen wurde die Menge der Mikropartikel nicht-apoptotischer und apoptotischer Zellen auf die gleiche Anzahl eingestellt. Bei den ETP-Messungen weiterhin eine signifikant erhöhte prokoagulatorische Aktivität (Daten nicht gezeigt).

Das bedeutet, dass die erhöhte Thrombogenität apoptotischer Zellen durch die gleichzeitige Expression von TF und negativ geladenen Phospholipiden auf der Zelloberfläche erklärt werden kann. Bei den Mikropartikeln bestand hinsichtlich der Expression von TF und negativ geladenen Phospholipiden kein Unterschied. Das bedeutet, dass andere Eigenschaften als die TF-Expression oder die Fähigkeit, Annexin-V zu binden, die hohe prokoagulatorische Aktivität der Mikropartikel apoptotischer Zellen determinieren.

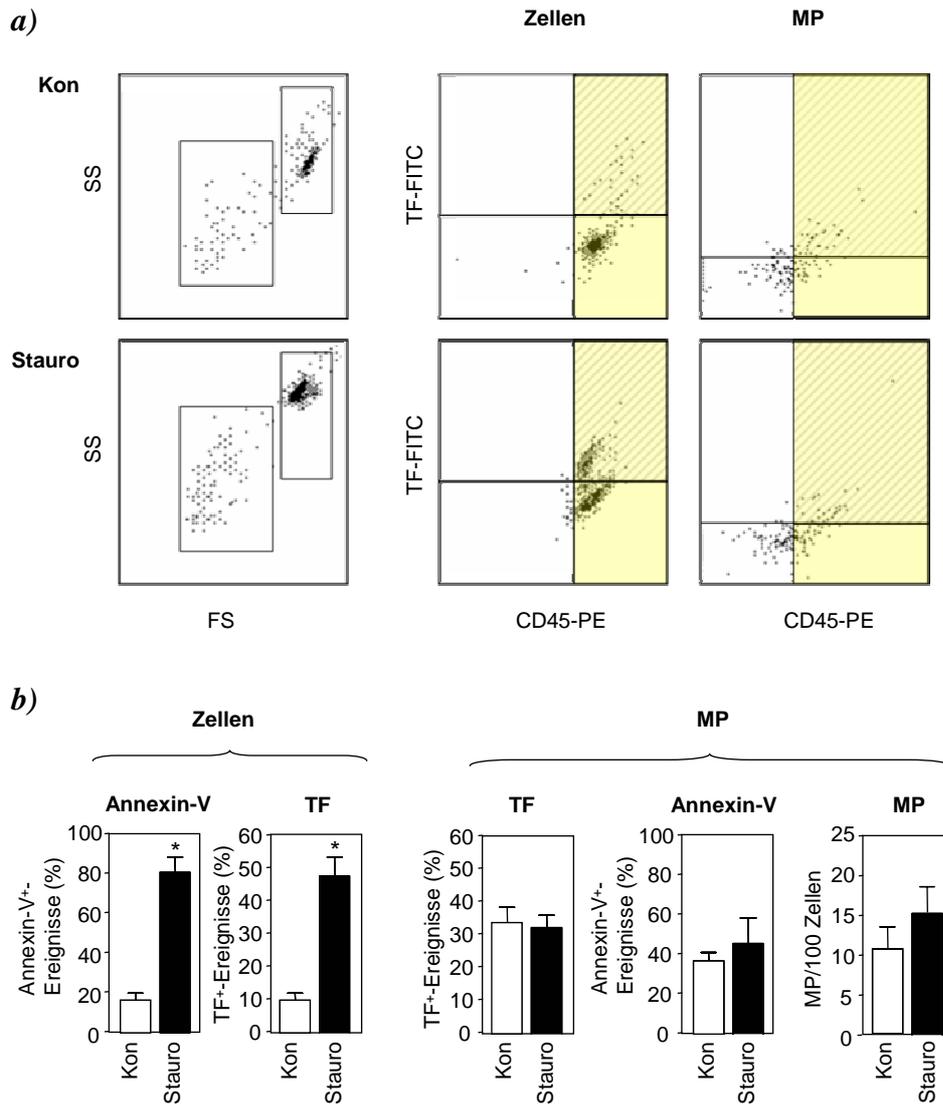


Abb. 17:

Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von TF und negativ geladenen Phospholipiden auf der Oberfläche von U937-Zellen und Mikropartikeln. Die Apoptose wurde durch Staurosporin (Stauro, 2 μ M, 24 h) induziert. Kontrolle = Kon. **a)** Repräsentative Originalmessungen (SS, Seitwärtsstreulicht; FS, Vorwärtsstreulicht) und **b)** quantitative Auswertung aus n = 6 Experimenten. *, p < 0,05 vs. Kontrolle.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Mikropartikel von nicht-apoptischen und apoptotischen Zellen mittels Western-Blot hinsichtlich der Expression von TF untersucht. Die Detektion von TF erfolgte mittels „ECL Advance Western Blotting Detection Kit“. In den Lysaten der Mikropartikel der Kontrollzellen konnte TF mit einem Molekulargewicht von 47 kD detektiert werden (Abb. 18). In den Lysaten der Mikropartikel der apoptotischen Zellen wurde eine 47 kD große Bande sowie eine etwa 27 kD große Bande detektiert. Die 47 kD große

Bande entsprach der Größe der vollständig glykosylierten Form von TF, die 27 kD große Bande entsprach der Größe der unglykosylierten Form des Proteins. Alternativ könnte diese kleinere Bande auch alternativ gesplizetem TF entsprechen.

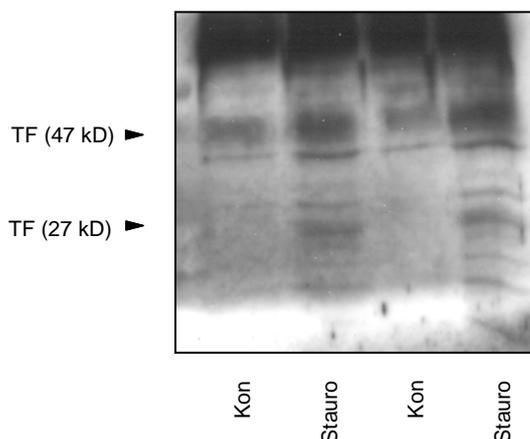


Abb. 18:

Detektion von TF in Mikropartikeln (MP) und Zelllysaten (Zellen) mittels Western-Blot. Die Apoptose wurde durch Staurosporin (Stauro, 2 μ M, 24 h) induziert. Repräsentative Darstellung von n = 6 Experimenten.

Die Mikropartikel apoptotischer Zellen führten zu einer signifikant stärkeren Thrombinbildung (Abb. 15), unterschieden sich bei der durchflusszytometrischen Analyse aber nicht hinsichtlich der Expression von TF oder der Bindung von Annexin-V (Abb. 17). Die in Abb. 18 detektierte TF-Bande mit der Größe von 27 kD könnte eine Erklärung für die erhöhte prokoagulatorische Aktivität der apoptotischen Mikropartikel sein, da diese Bande nicht in Lysaten nicht-apoptotischer Mikropartikel detektiert werden konnte. Es wäre vorstellbar, dass die 27 kD große TF-Form eine erhöhte prokoagulatorische Aktivität im Vergleich zu der 47 kD großen TF-Form aufweist. Die erhöhte prokoagulatorische Aktivität wäre dementsprechend direkt auf TF zurückzuführen. Andererseits könnte die erhöhte prokoagulatorische Aktivität apoptotischer Mikropartikel auch durch indirekte Mechanismen hervorgerufen worden sein. Der Begriff TF-„Encryption“ beschreibt die temporäre, reversible Inaktivierung von TF durch bisher wenig verstandene Mechanismen. Die erhöhte prokoagulatorische Aktivität apoptotischer Mikropartikel im Vergleich zu nicht-apoptotischen Mikropartikeln könnte also auch dadurch erklärt werden, dass bei den nicht-apoptotischen Mikropartikeln eine Inaktivierung (TF-„Encryption“) vorlag und dass diese Inaktivierung bei den apoptotischen Mikropartikeln aufgehoben war. Die zwei wichtigsten Proteine, die im Zusammenhang mit TF-„Encryption“ diskutiert werden, sind Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) und Glucose Regulated

Protein 78 (GRP 78). Der Einfluss dieser beiden Proteine sollte in weiteren Versuchsreihen untersucht werden.

3.2.3 Expression von Tissue Factor Pathway Inhibitor und Glucose Regulated Protein 78

Es gibt Hinweise darauf, dass ein Ungleichgewicht des Expressions-Verhältnisses TF:TFPI für eine erhöhte Thrombogenität zellulärer Mikropartikel verantwortlich sein kann (Brisset et al., 2003; Ott et al., 2001).

GRP78 (glucose regulated protein 78) könnte ebenfalls bei der TF-„Encryption“ der nicht-apoptotischen Mikropartikel beteiligt sein. GRP78 ist ein Protein, das normalerweise im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist und dort für die richtige Faltung neu synthetisierter Proteine sowie Vermeidung der Bildung von Proteinaggregaten verantwortlich ist (Lee, 2001). Eine Arbeit von Watson et al. (2003) hat gezeigt, dass die Überexpression von GRP78 zu einer verminderten prokoagulatorischen Aktivität in Zellen führt. Diese Untersuchung wurde durch eine Arbeit von Bhattacharjee et al. (2005) erweitert, in der die Autoren demonstrieren konnten, dass auf der Oberfläche exprimiertes GRP78 zu einer direkten Hemmung der prokoagulatorischen Aktivität führt.

3.2.3.1 Tissue Factor Pathway Inhibitor

Zunächst wurde die Expression von TFPI in Zelllysaten sowie in Ultrazentrifugationsüberständen und Ultrazentrifugationsrückständen mittels Western Blot untersucht (Abb. 19 a). In den Zelllysaten konnte TFPI detektiert werden. Sowohl in den Ultrazentrifugationsüberständen als auch den –rückständen konnte kein TFPI nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass TFPI im Zellüberstand weder in einer löslichen Form noch in einer Mikropartikel-gebundenen Form vorlag bzw. das Expressionsniveau von TFPI im Zellüberstand und in Mikropartikeln unterhalb der Nachweisgrenze des Western-Blots lag.

Der in den Western-Blot-Versuchen eingesetzte Anti-TFPI-Antikörper vermag TFPI funktionell zu inhibieren. Daher wurde in Kontrollversuchen dieser Antikörper mit Mikropartikeln nicht-apoptotischer Zellen inkubiert, um den funktionellen Einfluss von TFPI auf die Thrombogenität nicht-apoptotischer Mikropartikel zu bewerten. Die Inkubation der Mikropartikel mit Anti-TFPI-Antikörper führte zu keiner Erhöhung der prokoagulatorischen Aktivität (Abb. 19 b). Das bedeutet, dass TFPI unter diesen Versuchsbedingungen nicht zu einer TF-„Encryption“ führte. Die erhöhte prokoagulatorische Aktivität apoptotischer Mikropartikel kann nicht durch ein Ungleichgewicht des Verhältnisses TF:TFPI erklärt werden, weil TFPI keinen Einfluss auf die prokoagulatorische Aktivität der Mikropartikel nicht-apoptotischer Zellen besaß.

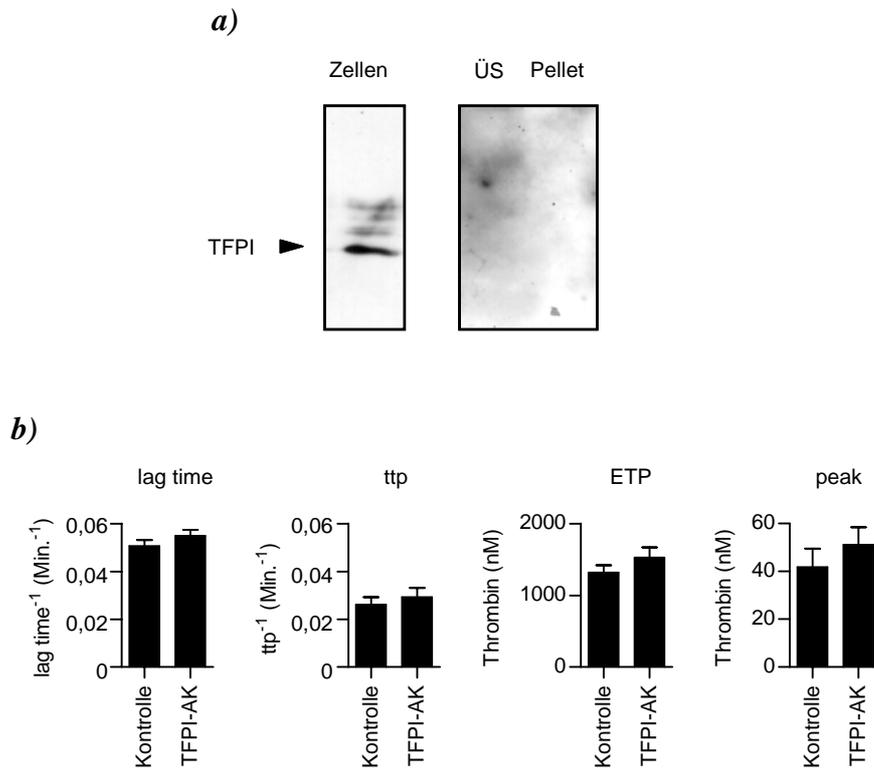


Abb. 19:

Einfluss von TFPI auf die Thrombogenität der Zellüberstände nicht-apoptotischer Zellen. **a)** Western-Blot. Zelllysate = Zellen. ÜS = Ultrazentrifugationsüberstand. Pellet = Ultrazentrifugationsrückstand. **b)** TF-Aktivitätsbestimmung im Zellüberstand durch Messung des ETP. Bewertung des Einflusses von TFPI auf die prokoagulatorische Aktivität der Mikropartikel durch Inkubation mit Anti-TFPI-Antikörpern (10 µg/ml, 1 h). Repräsentative Originalabbildungen und quantitative Auswertung aus n = 4 Experimenten. *, p < 0,05 vs. Kontrolle.

3.2.3.2 Glucose Regulated Protein 78

Die Expression von GRP78 wurde zunächst in U937-Zelllysaten mittels Western-Blot untersucht (Abb. 20 a). Im Western-Blot wurde eine Doppelbande detektiert. Mittels linearer Regression wurde das Molekulargewicht dieser Banden ermittelt.

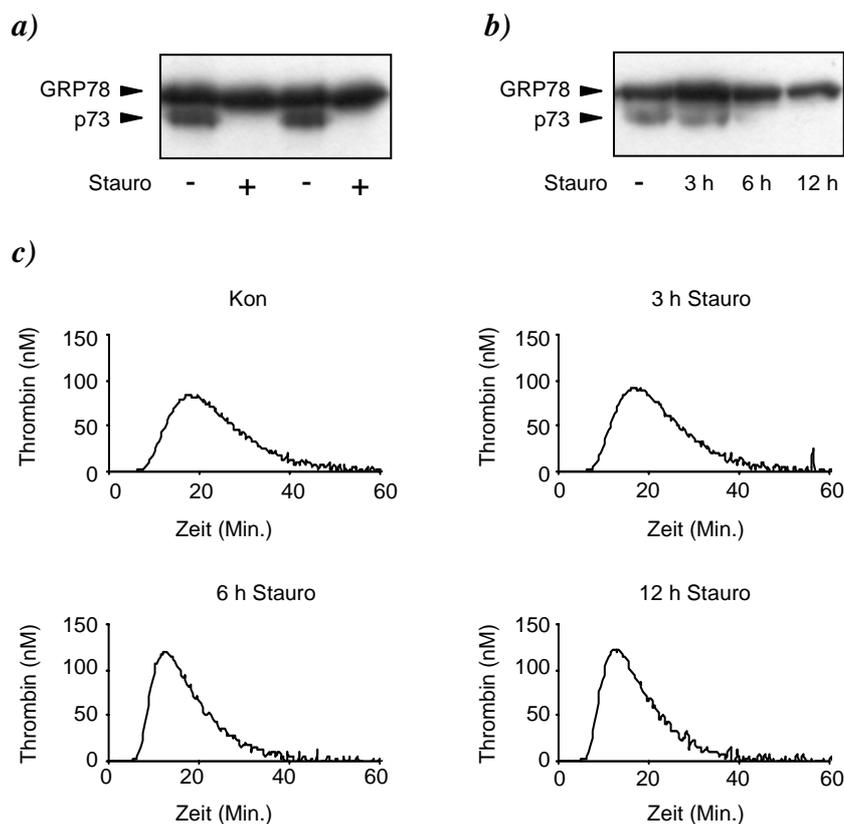


Abb. 20:

Nachweis von GRP78 und Thrombogenitätsbestimmung in apoptotischen und nicht-apoptotischen Zellen. **a)** Western-Blot aus Zelllysaten (ohne und mit Zusatz von Staurosporin, 2 μ M, 24 h). **b)** Western-Blot, zeitabhängige Regulation von GRP78 durch Staurosporin-induzierte Apoptose (Stauro, 2 μ M). **c)** Thrombogenitätsbestimmung gewaschener nicht-apoptotischer (Kon) und apoptotischer (Stauro, 2 μ M) U937-Zellen durch Messung des ETP. Repräsentative Originalmessungen aus n = 2 Experimenten.

Die obere Bande (GRP78) entsprach dem erwarteten Molekulargewicht von 78 kD, die untere Bande hatte ein Molekulargewicht von 73 kD (p73). Die obere dieser Banden wurde durch Apoptose nicht reguliert, die untere Bande wurde durch Apoptose herabreguliert. Um das Verschwinden der unteren Bande mit der Thrombogenität der U937-Zellen zu korrelieren, wurden die Zellen 3 h, 6 h bzw. 12 h nach Induktion der Apoptose gewaschen und die Thrombogenität der gewaschenen Zellen durch ETP-Messung bestimmt. Ein Teil der Zellen wurde zur GRP78-Bestimmung mittels Western-Blot verwendet. Die unteren Bande (p73)

wurde zeitabhängig durch Induktion der Apoptose herabreguliert. Nach ca. 6 h kam es zu einer vollständigen Herabregulation dieser Bande (Abb. 20 b). Die obere Bande (GRP78) wurde durch Induktion der Apoptose nicht beeinflusst. Gleichzeitig mit der schwächer werdenden unteren Bande stieg die Thrombogenität apoptotischer Zellen (Abb. 20 c). Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die p73-Bande unter den gewählten Versuchsbedingungen eine wichtige Rolle bei der TF-„Encryption“ nicht-apoptotischer Mikropartikel spielen könnte.

In weiteren Untersuchungen wurde daher versucht, GRP78 in Mikropartikeln zu detektieren. Außerdem wurde zur Kontrolle die Regulation von GRP78 durch Inkubation der Zellen mit PMA (100 nM, 24 h) untersucht. Die Zellaktivierung mit PMA führte zu keiner Erhöhung der Thrombogenität der Mikropartikel (Abb. 16) und der Zellen (Daten nicht gezeigt). Sollte die Regulation der unteren Bande eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung von TF spielen, so müsste sie in den PMA-behandelten Zellen oder aber in den Mikropartikeln zu finden sein.

Interessanterweise kam es in den PMA-stimulierten Zellen zu einer ähnlichen Herabregulation der unteren GRP78-Bande wie in Staurosporin-behandelten Zellen (Abb. 21 a). In zellulären Mikropartikeln konnte GRP78 jedoch nicht nachgewiesen werden (Abb. 21 b).

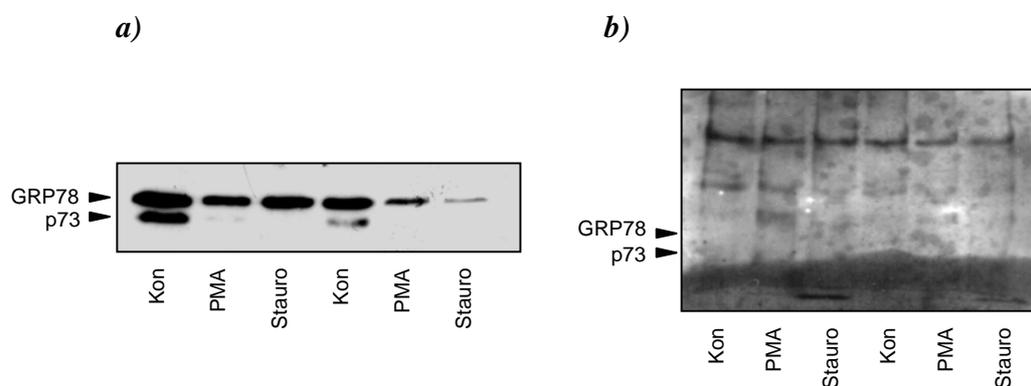


Abb. 21:

Nachweis von GRP78. *a)* Zelllysate. Kon = unbehandelte Zellen, PMA = 24 h PMA (100 nM), Stauro = 24 h Staurosporin (2 μ M). *b)* Korrespondierende Mikropartikel aus Zellüberständen. n = 2.

Das bedeutet, dass wahrscheinlich keine Regulation der prokoagulatorischen Aktivität nicht-apoptotischer Mikropartikel durch GRP78 erfolgt. Nach Aktivierung der Zellen mit PMA kam es zu einer Herabregulation der unteren GRP78-Bande. Diese Herabregulation stellte einen Gegensatz zu der fehlenden Steigerung der Thrombogenität PMA-aktivierter Zellen (Daten nicht gezeigt) dar. Die Mikropartikel von Kontrollzellen und PMA-aktivierten Zellen hatten keine so große prokoagulatorische Aktivität wie die Mikropartikel apoptotischer Zellen.

Die fehlende Detektion von GRP78 in Western-Blot-Analysen zeigte, dass eine Beteiligung von GRP78 an einer möglichen TF-„Encryption“ der Mikropartikel aus Kontrollzellen und PMA-aktivierten Zellen unwahrscheinlich war.

3.2.4 Proteomische Analyse von Zellmembranen und Mikropartikeln

Nach den bisherigen Ergebnissen musste die Regulation der prokoagulatorischen Aktivität der Mikropartikel durch GRP78 bzw. TFPI als unwahrscheinlich angesehen werden.

Daher wurde in einem globaleren Ansatz (2D-Gelelektrophorese) das Proteom der Zellmembranen bzw. Mikropartikel apoptotischer und nicht-apoptotischer Zellen analysiert. Da Mikropartikel aus Zellmembranen hervorgehen, wurden Plasmamembranen nach der Methode von Barber & Jamieson (1970) präpariert.

Die Auftrennung der Proteine mittels 2D-Gelelektrophorese lieferte eine Vielzahl unterschiedlich regulierter Proteine. In Abb. 22 ist exemplarisch ein Gel einer apoptotischen Probe dargestellt. Unterschiedlich regulierte Proteine sind farblich markiert. Unter dem Gel finden sich ebenfalls exemplarisch drei ausgewählte regulierte Proteine, um den Unterschied zwischen apoptotischen und nicht-apoptotischen Zellmembranen zu verdeutlichen. Die regulierten Proteine wurden ausgestanzt und zur massenspektrometrischen Analyse vorbereitet.

Da die Proteinmenge der isolierten Mikropartikel deutlich geringer war als die der isolierten Plasmamembranen, musste bei der Färbung der Gele auf eine wesentlich sensitivere Silberfärbung zurückgegriffen werden. Die höhere Sensitivität birgt jedoch die Schwierigkeit, dass unterschiedlich regulierte Proteine schwieriger erkannt werden können. Daher konnten in den Gelen der Mikropartikel weniger unterschiedlich regulierte Proteine detektiert werden (Abb. 23). Die regulierten Punkte wurden ebenfalls ausgestanzt und zur massenspektrometrischen Analyse vorbereitet.

Die Sequenzierung der regulierten Proteine der Zellmembranen und Mikropartikel wird im Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie durchgeführt werden und stellt die Grundlage für ein Folgeprojekt dar.

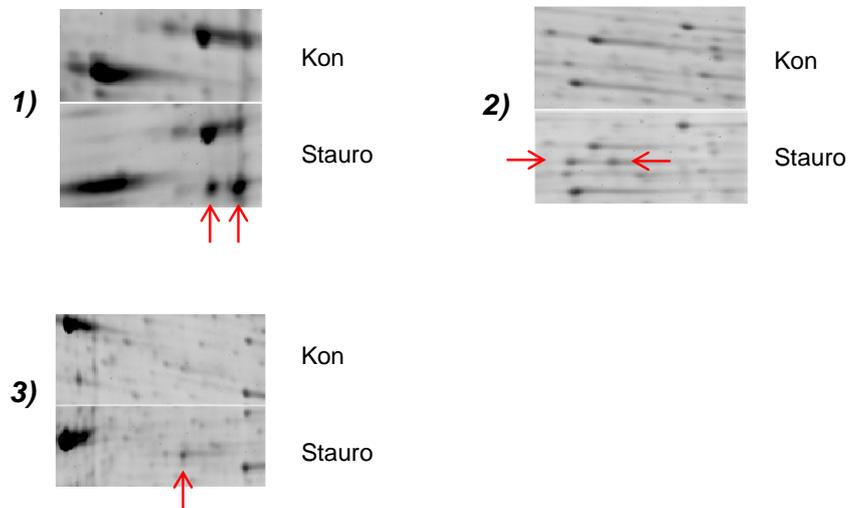
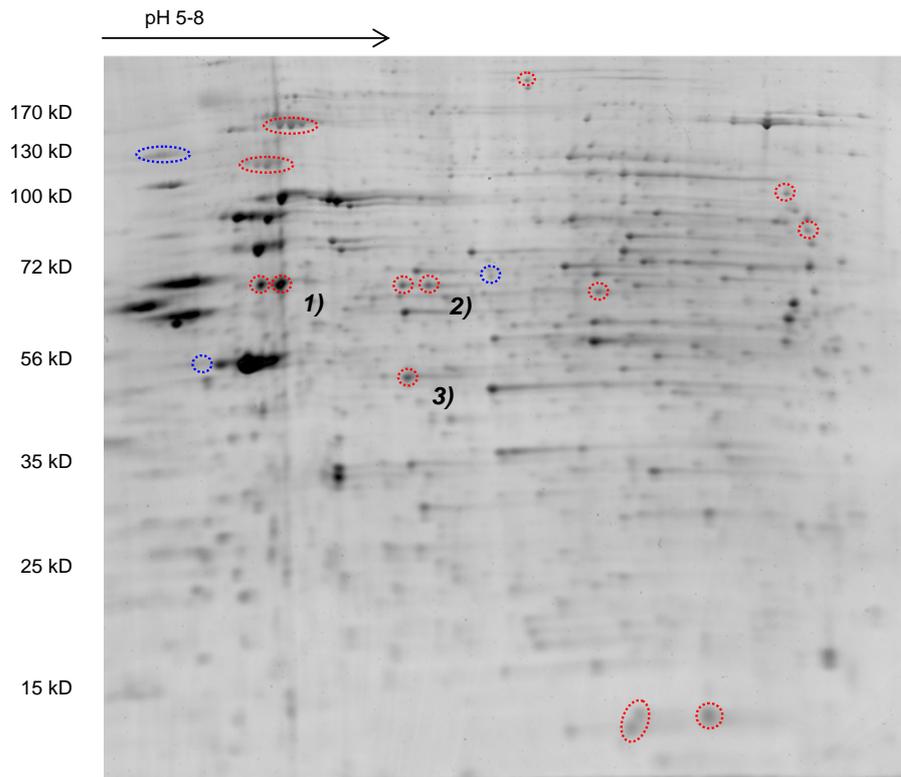


Abb. 22:

2D-Gelelektrophorese von Zellmembranen. Repräsentatives Gel einer apoptotischen Probe aus je $n = 3$ Gelen mit Proben apoptotischer und nicht-apoptotischer Zellen. blau = Herabregulation in apoptotischen Zellen, rot = Heraufregulation in apoptotischen Zellen. 1), 2), 3) exemplarische regulierte Proteine.

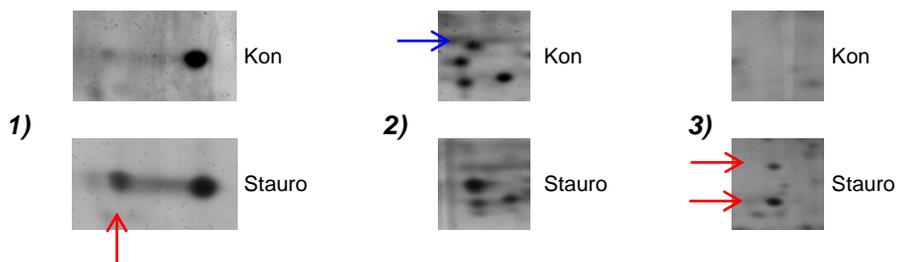
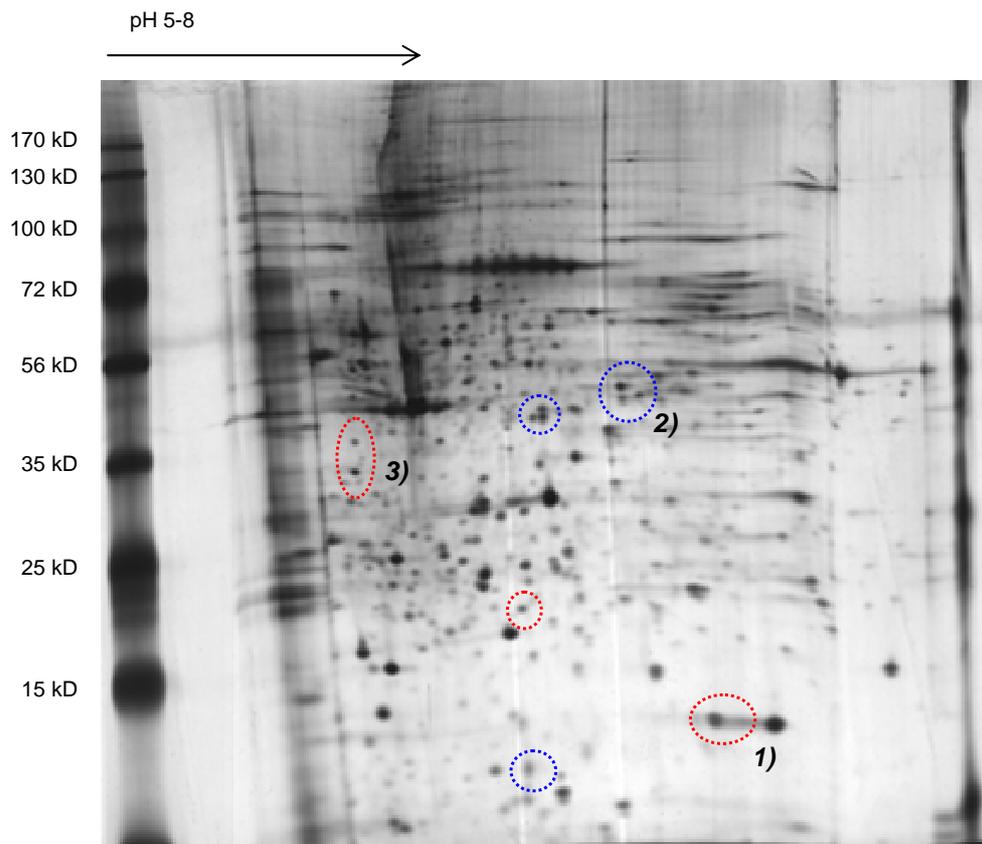


Abb. 23: 2D-Gelelektrophorese von Mikropartikeln. Repräsentatives Gel einer nicht-apoptotischen Probe aus je n = 3 Gelen mit Proben apoptotischer und nicht-apoptotischer Mikropartikel. blau = Herabregulation in apoptotischen Mikropartikeln, rot = Heraufregulation in apoptotischen Mikropartikeln. 1), 2), 3) exemplarische regulierte Proteine.

3.3 Regulation von P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 unter apoptotischen Bedingungen

3.3.1 Apoptose-induzierte Herabregulation von P-Selectin Glycoprotein Ligand 1

PSGL-1 ist wichtig für den Einbau von TF-haltigen Mikropartikeln in wachsende Thromben. Es ist bekannt, dass die Zellaktivierung durch PMA zu einer Reduktion von PSGL-1 auf der Oberfläche monozytärer Zellen führt (Davenpeck et al., 2000). Daher wurde zunächst die Regulation von PSGL-1 durch Apoptose mit der durch PMA verglichen.

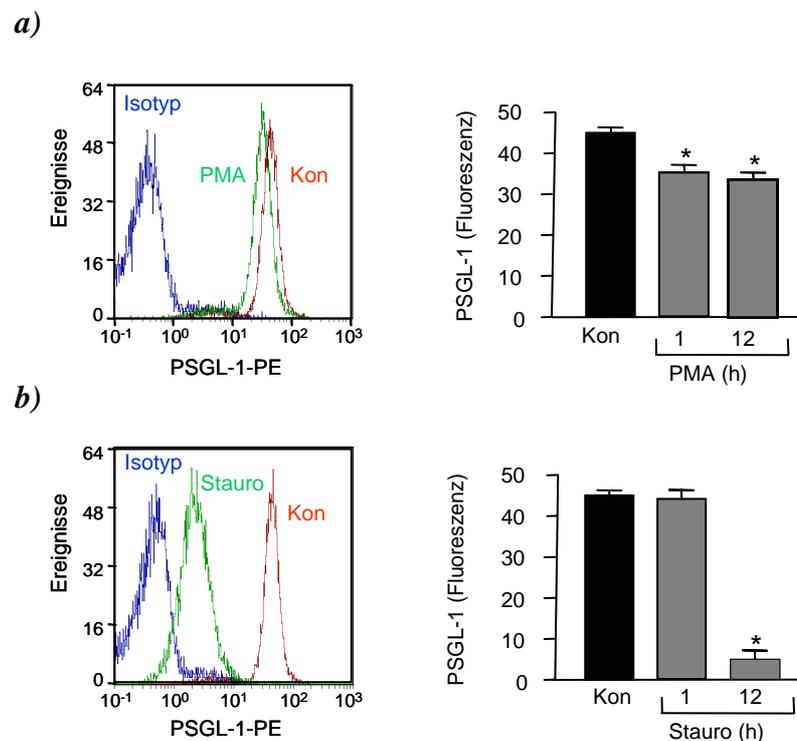


Abb. 24:

PSGL-1-Expression auf U937-Zellen *a)* nach Stimulation mit PMA (100 nM) und *b)* nach Induktion der Apoptose mit Stausporin (Stauro, 2 μ M). Repräsentative Originalhistogramme und quantitative Auswertung aus n = 6 Experimenten. *, p < 0,05 vs. Kontrolle (Kon).

In Kontrollversuchen wurde zunächst überprüft, ob der Effekt von Davenpeck et al. (2000) auch mit U937-Zellen reproduzierbar war. Dazu wurden U937-Zellen

1 h bzw. 12 h mit PMA (100 nM) inkubiert und die PSGL-1-Expression durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Inkubation mit PMA führte zu einer schnellen Abnahme der PSGL-1-Expression (ca. 20 – 30%), die jedoch auch nach längerer Inkubation nicht weiter abnahm (Abb. 24 a).

Die Behandlung der Zellen mit Staurosporin führte nach einer 1-stündigen Inkubation zu keiner Abnahme der PSGL-1 Expression (Abb. 24 b). Bei einer 12-stündigen Inkubation kam es jedoch zu einer vollständigen (> 90%) Abnahme der PSGL-1-Expression.

Um die Relevanz der Befunde, die in einer monozytären Zelllinie erhoben wurden, zu bewerten, wurde eine mögliche Regulation von PSGL-1 bei Apoptose auch bei Monozyten, die aus frischem Vollblut isoliert wurden, untersucht.

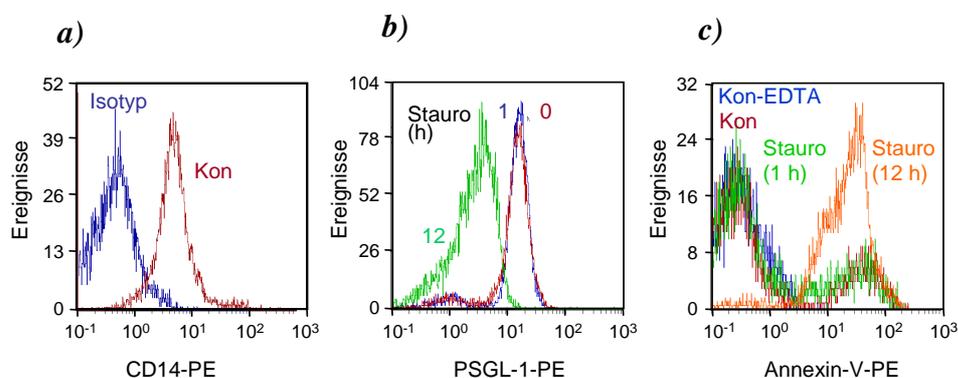


Abb. 25:

Regulation der PSGL-1-Expression bei Apoptose von Monozyten. *a)* Identifizierung der Monozyten mittels Anti-CD14-Antikörpern. *b)* PSGL-1-Expression unter dem Einfluss von Staurosporin (Stauro, 2 μ M). *c)* Nachweis der Apoptose mittels Annexin-V-Bindung.

Monozyten wurden anhand der Streulichteigenschaften und CD14-Expression identifiziert (Abb. 25 a). Durch Behandlung der Monozyten mit Staurosporin für 12 h kam es zu einer vollständigen Herabregulation von PSGL-1 (Abb. 25 b). Eine 1-stündige Inkubation der Monozyten mit Staurosporin hatte keinen Einfluss auf die PSGL-1-Expression. Die abnehmende PSGL-1-Expression korrelierte mit der Apoptose (Annexin-V-Bindung) (Abb. 25 c). Das bedeutet, dass die Apoptose nicht nur in U937-Zellen, sondern auch in humanen Monozyten zu einer vollständigen Herabregulation von PSGL-1 führt.

In Abb. 26 a ist die Abnahme der PSGL-1-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der Apoptose dargestellt. Auf der Seite rechts neben dem Trennstrich befinden sich PSGL-1-positive Zellpopulationen, auf der linken Seite PSGL-1-negative Populationen. Auffällig war, dass nach Induktion der Apoptose

keine allmähliche Linksverschiebung der PSGL-1-Fluoreszenz erfolgte, sondern dass die PSGL-1-positive Population in dem Maße abnahm, wie die PSGL-1-negative Population zunahm. Das bedeutet, dass die Herabregulation von PSGL-1 nicht auf allen Zellen gleichzeitig ablief. Zunächst war PSGL-1 nur auf einigen Zellen herabreguliert, im Laufe der Zeit nahm die Anzahl der Zellen zu, auf denen PSGL-1 herabreguliert war.

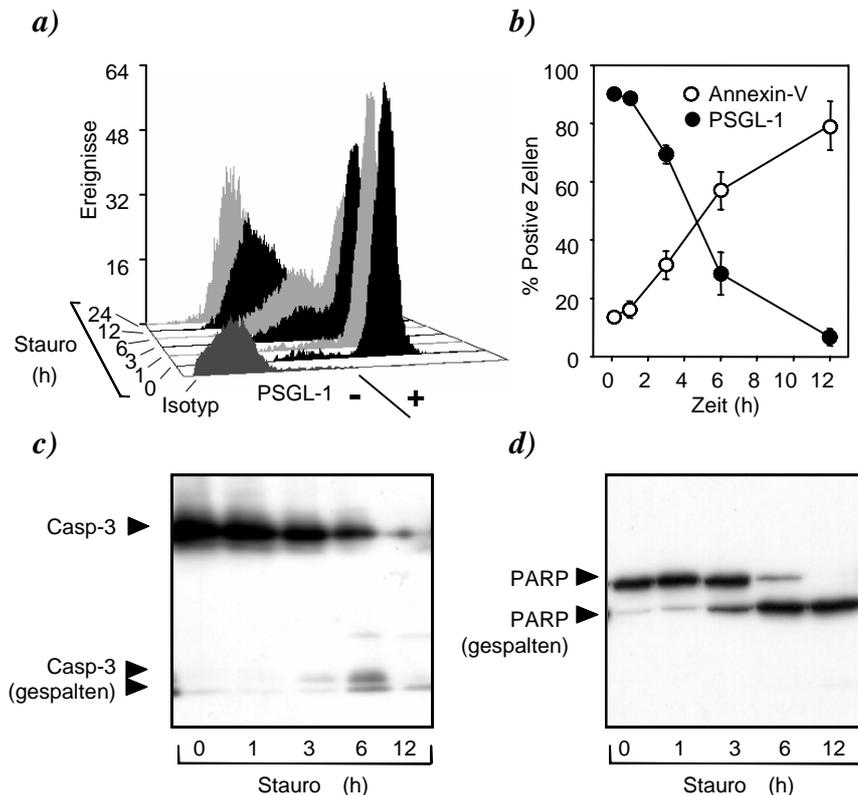


Abb. 26:

Kinetik der PSGL-1-Herabregulation in U937-Zellen. **a)** Originalhistogramme der durchflusszytometrischen PSGL-1-Expressionsbestimmung nach Induktion der Apoptose mit Staurosporin (Stauro, 2 μ M, 0-24 h). +, PSGL-1-positive Population; -, PSGL-1-negative Population. **b)** Korrelation der PSGL-1-Expression mit der Apoptose (Annexin-V-Bindung). **c)**, **d)** Kinetik der Staurosporin-induzierten Apoptose, nachgewiesen durch Caspase-3-Spaltung und PARP-Spaltung. Repräsentative Originalabbildungen und quantitative Auswertung aus $n = 4$ Experimenten.

Die zeitliche Abnahme der PSGL-1-Expression korrelierte mit dem Grad der Apoptose. Je mehr Zellen Annexin-V binden konnten, desto geringer wurde die Zahl der PSGL-1-positiven Zellen (Abb. 26 b). Die Kinetik der Apoptose wurde zusätzlich zur Annexin-V-Bindung durch Caspase-3-Spaltung und PARP-Degradierung demonstriert. Auch hier korrelierte die Zunahme der Apoptose mit einer Abnahme der PSGL-1-Expression. Diese Versuche zeigten, dass die

Expression von PSGL-1 auf der Zelloberfläche vom Grad der Apoptose abhing. Je weiter die Apoptose fortgeschritten war, desto geringer wurde die Expression von PSGL-1.

Um einen substanzspezifischen Effekt auszuschließen, wurden außer mit Staurosporin Kontrollexperimente mit zwei weiteren Apoptose-Induktoren durchgeführt. Die Inkubation der Zellen mit Aktinomycin D (1 $\mu\text{g/ml}$) und Etoposid (10 μM) führte ebenfalls zu einer fast vollständigen Herabregulation der PSGL-1-Expression (Abb. 27).

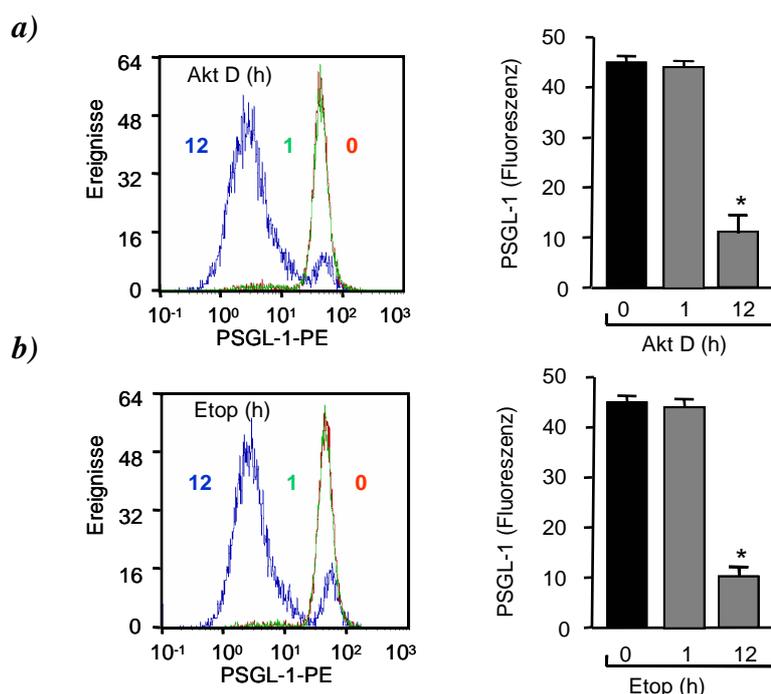


Abb. 27:

PSGL-1 Expression auf U937-Zellen nach Inkubation mit **a)** Aktinomycin D (Akt D, 1 $\mu\text{g/ml}$) und **b)** Etoposid (Etop, 10 μM). Repräsentative Originalhistogramme und quantitative Auswertung aus $n = 4$ Experimenten. *, $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Durch Induktion der Apoptose war PSGL-1 nicht mehr auf der Oberfläche apoptotischer Zellen nachzuweisen. Daher sollte in nachfolgenden Experimenten geklärt werden, über welchen Mechanismus PSGL-1 durch Apoptose herabreguliert wurde. Dazu wurde zunächst eine Analyse der PSGL-1-Expression mittels Western-Blot und Immunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Die Versuche sollten klären, ob PSGL-1 internalisiert wurde und daher nicht mehr auf der Oberfläche nachzuweisen war. In diesem Fall müsste PSGL-1 in Zelllysaten und permeabilisierten Zellen detektiert werden können.

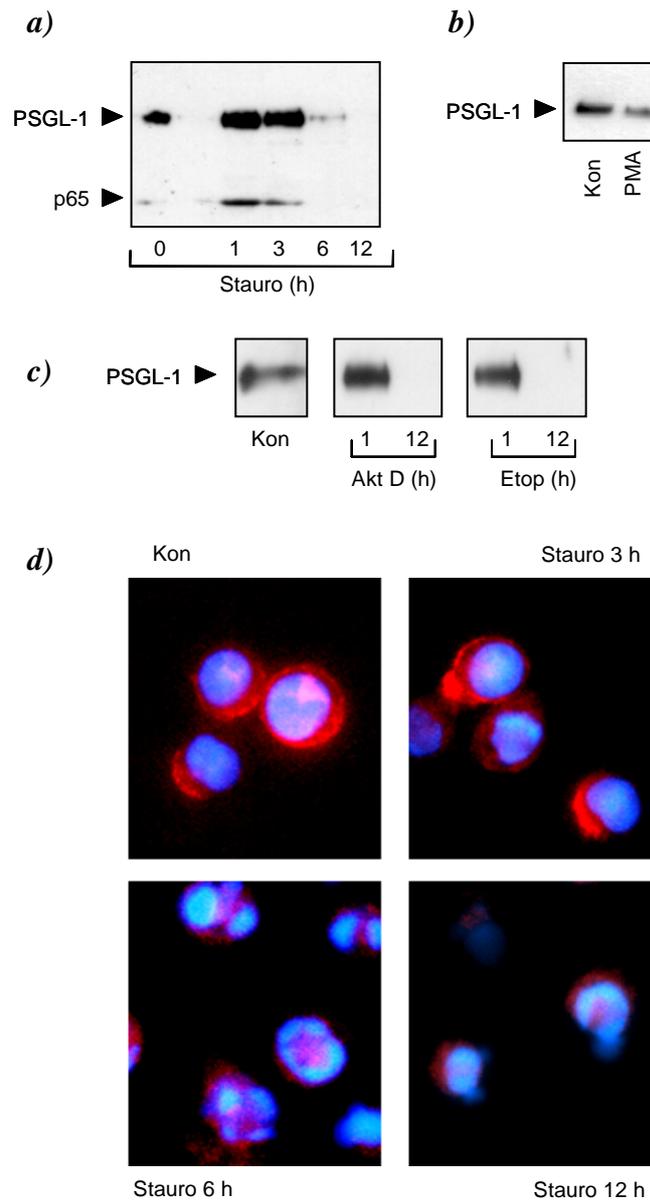


Abb. 28:

Nachweis von PSGL-1 in U937-Zellen in Gesamtzellextrakten und intrazellulären Kompartimenten. *a)*-*c)* Western Blot, PSGL-1 in Zellysaten nach Inkubation mit *a)* Staurosporin (Stauro, 2 µM), *b)* PMA (100 nM, 1 h), *c)* Aktinomycin D (Akt D, 1 µg/ml) und Etoposid (Etop, 10 µM). *d)* Immunfluoreszenzmikroskopie mit Methanol-permeabilisierten Zellen nach Inkubation mit Staurosporin (Stauro, 2 µM). Antikörper: PL-1 (556052, BD Biosciences, Heidelberg). Rot = PSGL-1, blau = Zellkerne. Kontrolle = Kon. Repräsentative Darstellung von n = 3 Experimenten.

Nach Induktion der Apoptose wurde eine zeitabhängige, komplette Herabregulation von PSGL-1 in den Gesamtzellextrakten Staurosporin-behandelter Zellen beobachtet (Abb. 28 a). Es wurden zwei Banden detektiert. Die obere detektierte Bande entsprach der erwarteten Größe von 120 kD (PSGL-1-Monomer). Die untere Bande entsprach einem Molekulargewicht von 65 kD (p65). Die p65-Form wurde durch Induktion der Apoptose ebenfalls reguliert. Eine solche Form wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben. Das PSGL-1-Dimer (240 kD) konnte vermutlich wegen der Lysebedingungen nicht detektiert werden.

Die Behandlung der Zellen mit Aktinomycin D und Etoposid führte ebenfalls zu einer vollständigen Herabregulation des zellulären PSGL-1-Gehalts (Abb. 28 c). In Übereinstimmung mit den durchflusszytometrischen Daten (Abb. 24) konnte eine schwache Reduktion der PSGL-1-Expression durch Behandlung der Zellen mit PMA beobachtet werden (Abb. 28 b).

Zusätzlich zu der Western-Blot-Analyse wurde die Reduktion des zellulären PSGL-1-Gehalts mittels Immunfluoreszenzmikroskopie bestätigt (Abb. 28 d). In diesen Versuchen konnte eine zeitliche Abnahme der PSGL-1-Fluoreszenz in Methanol-permeabilisierten Zellen beobachtet werden. PSGL-1 akkumulierte nicht in intrazellulären Kompartimenten. Das bedeutet, dass durch Apoptose PSGL-1 in der gesamten Zelle herabreguliert wurde. Die Herabregulation von PSGL-1 auf der Zelloberfläche erfolgte nicht durch Internalisierung des Proteins.

Zusätzlich zu diesen Experimenten wurde untersucht, ob sich die Herabregulation von PSGL-1 durch Inhibitoren lysosomaler Enzyme verhindern lässt. Dazu wurden die Zellen 12 h mit Ammoniumchlorid (25 mM) bzw. Chloroquin (100 μ M) inkubiert und anschließend die Apoptose induziert. Die PSGL-1-Expression wurde 3 h bzw. 6 h nach Induktion der Apoptose durchflusszytometrisch gemessen. Durch Vorinkubation der Zellen mit Ammoniumchlorid kam es zu einer starken Verminderung der PSGL-1-Herabregulation (Abb. 29). Chloroquin hatte keinen Einfluss auf die Staurosporin-induzierte Herabregulation von PSGL-1. In einem Kontrollversuch wurde untersucht, ob die beiden Substanzen mit der Apoptose interferierten. Ammoniumchlorid führte zu einer verzögerten Apoptose, unter diesen Bedingungen entsprach die Inaktivierung von PARP nach 6 h der Inaktivierung von PARP nach 3 h unter Kontrollbedingungen (Abb. 29). Dies entsprach auch der gemessenen PSGL-1-Expression: in den Ammoniumchlorid-vorbehandelten Zellen entsprach die PSGL-1-Expression 6 h nach Induktion der Apoptose der PSGL-1-Expression 3 h nach Induktion der Apoptose in unbehandelten Zellen.

Ein lysosomaler Abbau von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen galt daher als unwahrscheinlich. Der hemmende Effekt von Ammoniumchlorid auf die Herabregulation von PSGL-1 war auf die antiapoptotischen Eigenschaften dieser Substanz zurückzuführen.

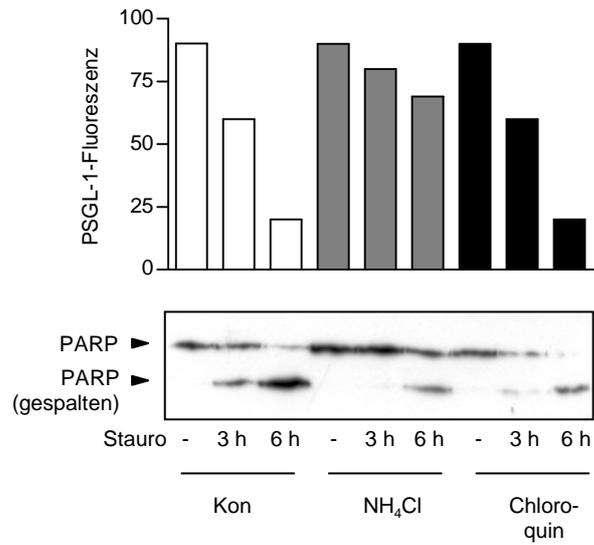


Abb. 29: PSGL-1-Fluoreszenz nach Inkubation der U937-Zellen mit Ammoniumchlorid (25 mM, 12 h) und Chloroquin (100 μ M, 12 h) und anschließender Induktion der Apoptose mit Staurosporin (2 μ M). Oben = Durchflusszytometrische Bestimmung von PSGL-1, unten = Einfluss der Lysosomen-Inhibitoren auf die Apoptose.

3.3.2 Transkriptionelle Regulation von P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 bei Apoptose

Eine mögliche transkriptionelle Regulation von PSGL-1 wurde mittels quantitativer PCR untersucht. Nach 3 h Inkubation mit Staurosporin war das Niveau der PSGL-1-mRNA-Expression auf ca. 50% gesenkt, nach weiteren 3 h lag nur noch 40% der initialen Kopienzahl vor (Abb. 30 a).

Um bewerten zu können, ob durch diese signifikante Abnahme der PSGL-1-mRNA-Expression die komplette Herabregulation des PSGL-1-Proteins durch Apoptose erklärt werden konnte, wurde die Halbwertszeit des PSGL-1-Proteins bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit dem Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximid inkubiert und die Expression von PSGL-1 zu verschiedenen Zeitpunkten (0-12 h) durchflusszytometrisch bestimmt. Nach einer 12-stündigen Inkubation mit Cycloheximid kam es zu einer 40%-igen Reduktion der PSGL-1 Expression (Abb. 30 b).

Das bedeutet, dass die Abnahme der PSGL-1-mRNA allenfalls eine Mitbeteiligung auf die Proteinexpression hatte, da PSGL-1 eine lange Halbwertszeit ($t_{1/2} > 12$ h) besitzt (Abb. 30 b). Durch Apoptose wurde PSGL-1 innerhalb von 6-12 h jedoch komplett abgebaut. Die Herabregulation von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen musste sehr wahrscheinlich durch andere Mechanismen ausgelöst worden sein als durch eine transkriptionelle Herabregulation.

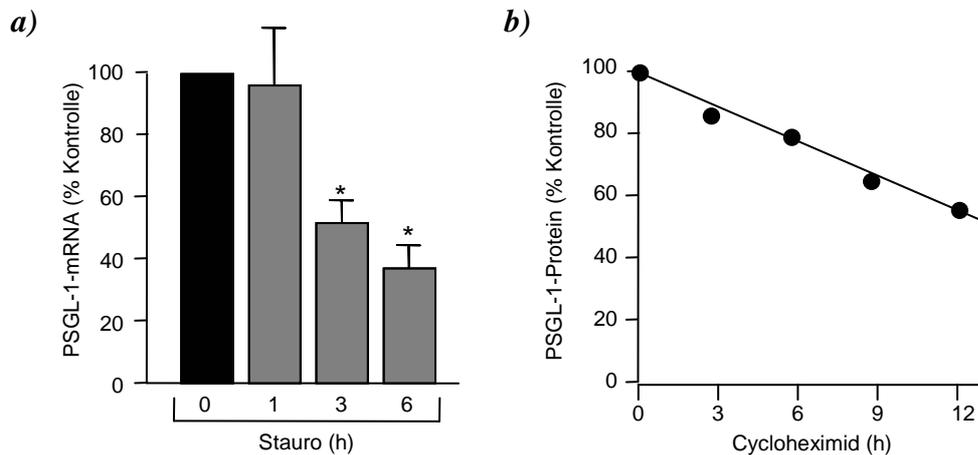


Abb. 30:

Transkriptionelle Regulation von PSGL-1 und Bestimmung der Halbwertszeit des PSGL-1-Proteins. **a)** Quantitative PCR. Die Apoptose wurde durch Staurosporin (Stauro, 2 μ M) induziert. **b)** Durchflusszytometrische Bestimmung der PSGL-1-Expression nach Inhibition der Proteinsynthese mit Cycloheximid (10 μ g/ml). Quantitative Auswertung von n = 3 Experimenten. *, p < 0,05 vs. Kontrolle.

3.3.3 Proteolytische Abspaltung von P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 durch Apoptose

Da eine transkriptionelle Herabregulation von PSGL-1 als möglicher Grund für das Verschwinden des Proteins von der Zelloberfläche unwahrscheinlich war, wurde überprüft, ob eine proteolytische Freisetzung von PSGL-1 aus der Membran erfolgte. Zu diesem Zweck wurde zunächst nach proteolytischen Fragmenten von PSGL-1 in den Zellüberständen (enthalten Mikropartikel-gebundene und lösliche Fragmente) gesucht. Um Mikropartikel-gebundene Fragmente von löslichen Fragmenten unterscheiden zu können, wurden zusätzlich zu den Zellüberständen Ultrazentrifugationsüberstände und Ultrazentrifugationsrückstände untersucht (Abb. 31 a). In den Zellüberständen von Kontrollzellen konnte eine lösliche, nicht-Mikropartikel-gebundene Form detektiert werden (p65). Natives PSGL-1 (Monomer und Dimer) wurde in der Mikropartikelfraktion im Ultrazentrifugationsrückstand gefunden. Die Freisetzung PSGL-1-haltiger Mikropartikel scheint dementsprechend eine konstitutive Eigenschaft monozytärer Zellen darzustellen. Nach einer 1-stündigen Stimulation der Zellen mit PMA wurde eine schwache Abnahme der Expression des nativen PSGL-1 (Monomer und Dimer) in der Mikropartikelfraktion detektiert. Die Expression des p65-Fragments war ebenfalls reduziert. Interessanterweise konnte ein Mikropartikel-gebundenes Fragment mit einem Molekulargewicht von 40 kD nach Stimulation der Zellen mit PMA detektiert werden. In Staurosporin-behandelten Zellen wurde ebenfalls eine schwache Reduktion des nativen PSGL-1 (Monomer und Dimer) sowie des p65-Fragments beobachtet. Es konnten jedoch keine anderen proteolytischen Fragmente als das p65-Fragment in den Zellüberständen gezeigt werden. Auch in der Mikropartikelfraktion wurden keine proteolytischen Fragmente detektiert. Daher wurde in einem weiteren Versuch überprüft, ob in den Zelllysaten nicht-apoptotischer und apoptotischer Zellen ein residuales Spaltprodukt von PSGL-1 zu erkennen war (Abb. 31 b). In den Proben nicht-apoptotischer Zellen konnte das PSGL-1-Monomer detektiert werden. Ebenso wurde in den Kontrollzellen das p65-Fragment nachgewiesen. Zusätzlich konnte ein ca. 97 kD großes Fragment von PSGL-1 in den nicht-apoptotischen Zellen detektiert werden. Aus vorangegangenen Versuchen war bekannt, dass PSGL-1 in der nativen Form (Monomer und Dimer) nicht mehr in apoptotischen Zellen detektierbar war. Interessanterweise konnte in den Lysaten apoptotischer Zellen aber auch kein PSGL-1-Spaltprodukt nachgewiesen werden.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus Abb. 31 a wurde mittels Durchflusszytometrie eine Reduktion von Mikropartikel-gebundenem PSGL-1 im Zellüberstand apoptotischer Zellen gemessen (Abb. 31 c). Die Mikropartikel der PMA-stimulierten Zellen zeigten im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte PSGL-1-Expression. Diese signifikante Erhöhung der PSGL-1-Fluoreszenz reflektierte möglicherweise das p40-Fragment in der Mikropartikelfraktion PMA-stimulierter Zellen.

Weil keine proteolytischen Fragmente von PSGL-1 in den Zellüberständen apoptotischer Zellen detektiert werden konnten, wurden U937-Zellen in einer weiteren Versuchsreihe mit einem PE-gekoppelten Anti-PSGL-1-Antikörper

vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion der Apoptose und eine 6-stündige Inkubation. Die Zellen wurden durch Zentrifugation von den Zellüberständen abgetrennt; die Fluoreszenz des Überstandes wurde mit einem Fluoreszenzspektrophometer und die der Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen. Im Fall einer proteolytischen PSGL-1-Abspaltung sollten die Zellüberstände apoptotischer Zellen eine stärkere Fluoreszenz aufweisen als die Überstände nicht-apoptotischer Zellen. Nach Induktion der Apoptose kam es im Vergleich zum Zellüberstand der Kontrollzellen zu einer signifikanten Zunahme der PE-Fluoreszenz im Zellüberstand apoptotischer Zellen (Abb. 31 d). Das bedeutet, dass die Behandlung der Zellen mit Staurosporin zu einer proteolytischen Abspaltung von der Zelloberfläche führte und somit auch zu einer Freisetzung PSGL-1-gebundener Anti-PSGL-1-Antikörper. Interessanterweise kam es durch die Vorinkubation der Zellen mit dem Anti-PSGL-1-Antikörper zu einer deutlichen Reduktion der Staurosporin-induzierten Herabregulation von PSGL-1 (Abb. 31 e). Das bedeutet, dass der Antikörper möglicherweise an einer Stelle bindet, an der die Proteolyse von PSGL-1 erfolgt. Dies würde auch erklären, warum keine proteolytischen Fragmente von PSGL-1 im Zellüberstand detektiert werden konnten.

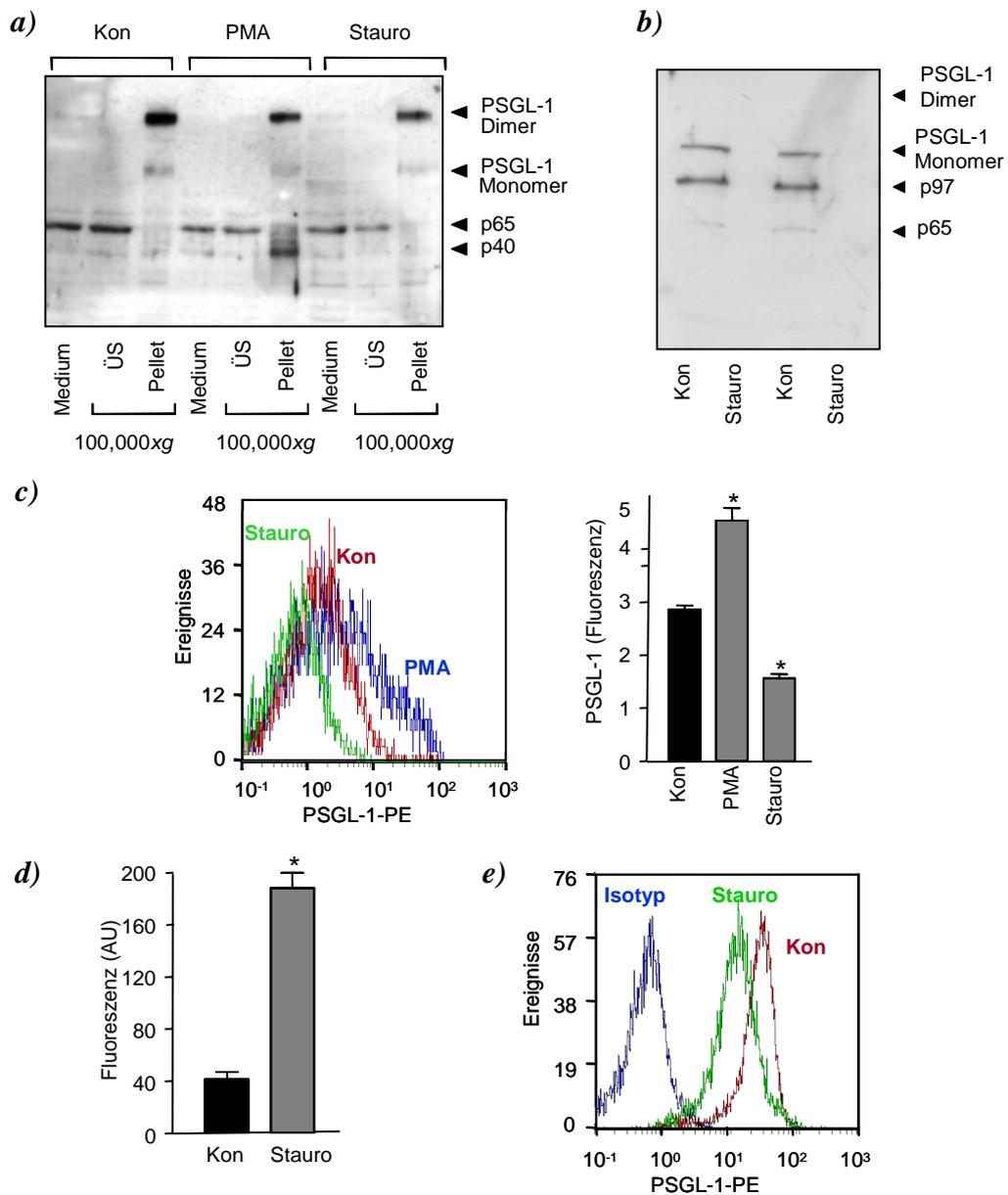


Abb. 31:

Nachweis von PSGL-1 und proteolytischen PSGL-1-Fragmenten in Mikropartikeln unbehandelter (Kon)-, PMA (100 nM, 12 h)- und Staurosporin (Stauro, 2 μ M, 12 h)-behandelter Zellen. **a)** Western-Blot des Zellüberstandes (Medium) sowie dessen Ultrazentrifugationsüberstandes (ÜS) und -rückstandes (Pellet). Antikörper (556052, BD Biosciences). **b)** Western-Blot der Zelllysate. Antikörper (H-300, Santa Cruz). **c)** Durchflusszytometrische Bestimmung der PSGL-1-Expression auf Mikropartikeln. **d)** Fluoreszenz im zellfreien Überstand Anti-PSGL-1-PE-markierter Zellen nach Inkubation mit Staurosporin (2 μ M, 6 h). **e)** Durchflusszytometrische Bestimmung der PSGL-1-Expression Anti-PSGL-1-PE-markierter Zellen nach Inkubation mit Staurosporin (2 μ M, 6 h). Originalhistogramme und quantitative Auswertung aus n = 3 Experimenten. *, p < 0,05 vs. Kontrolle.

3.3.4 Approximative Identifizierung der bei Apoptose P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 herabregulierenden Protease

Basierend auf den bisherigen Beobachtungen wurde in den folgenden Versuchen der Effekt verschiedener Protease-Inhibitoren auf die Apoptose-induzierte Abspaltung von PSGL-1 untersucht. In einer ersten Annäherung wurde postuliert, dass die verantwortliche Protease ein Membran-gebundenes Enzym ist. Diese Hypothese wurde dadurch unterstützt, dass die zeitabhängige Reduktion von PSGL-1 auf der Zelloberfläche nicht simultan erfolgte, sondern eher nach einem „Alles oder nichts“-Prinzip (vgl. Abb. 26). Bei einer simultanen Reduktion käme es zu einer gleichartigen Abnahme der Fluoreszenzintensität der Zellen. Bei der hier beobachteten Reduktion konnten jedoch distinkte PSGL-1-positive und PSGL-1-negative Populationen gemessen werden. Konsistent mit dieser Hypothese führte die Inkubation von Kontrollzellen in Zellüberständen apoptotischer Zellen zu keiner Verminderung der PSGL-1-Expression in den Kontrollzellen (Daten nicht gezeigt).

Um die für die Abspaltung von PSGL-1 verantwortliche Protease zu identifizieren, wurden Inhibitoren vier verschiedener Gruppen von Proteasen eingesetzt:

Serin-Protease-Inhibitoren:	
Pefabloc SC	0,25 mM
Aprotinin	0,3 µM
Cystein-Protease-Inhibitoren:	
E-64	10 µM
N-Ethylmaleimid	1 mM
Aspartat-Protease-Inhibitor:	
Pepstatin A	2 µM
Metalloproteinase-Inhibitoren:	
EDTA	10 mM
1,10-Phenanthrolin	5 mM
Galardin (GM 6001)	10 µM
Phosphoramidon	10 µM

Um eine Interferenz der Substanzen mit Staurosporin zu verhindern, wurde zunächst die Apoptose induziert, und erst 3 h danach wurden die Inhibitoren zum Kulturmedium gegeben. Der Zeitpunkt 3 h wurde deswegen gewählt, weil aus vorherigen Experimenten bekannt war, dass nach 3 h die Caspase-Kaskade bereits aktiviert, die PSGL-1-Expression auf der Oberfläche jedoch kaum beeinflusst war (vgl. Abb. 26 und Abb. 32 a).

In Abb. 32 a ist der zeitliche Verlauf der PSGL-1-Expression während der Apoptose dargestellt. Zum Zeitpunkt der Inhibitor-Zugabe (3 h Stauro) war die PSGL-1-Expression kaum beeinflusst. Zum Endpunkt der Versuche (6 h Stauro) war

PSGL-1 fast vollständig von der Oberfläche der Zellen abgespalten. Die Inhibitoren der Serin (Pefabloc, Aprotinin)-, Cystein (E-64)- und Aspartat (Pepstatin A)-Proteasen führten zu keiner Hemmung der Staurosporin-induzierten PSGL-1-Abspaltung (Abb. 32 b).

Danach wurde der Einfluss von Metalloprotease-Breitspektrum-Inhibitoren (EDTA, 1,10-Phenanthrolin, Galardin) auf die Apoptose-induzierte PSGL-1-Abspaltung untersucht. Interessanterweise führte die Inkubation der Zellen mit EDTA (Abb. 32 c) und mit Phenanthrolin (Daten nicht gezeigt) zu einer verringerten Expression von PSGL-1 auf der Zelloberfläche, während Galardin keinen direkten Einfluss auf die PSGL-1-Expression hatte. EDTA, 1,10-Phenanthrolin und Galardin führten zu einer fast vollständigen Hemmung der Apoptose-induzierten PSGL-1-Abspaltung (Abb. 32 d). Interessanterweise führte der Cystein-Protease-Inhibitor N-Ethylmaleimid (NEM), ähnlich wie die Metalloprotease-Inhibitoren (EDTA, 1,10-Phenanthrolin und Galardin), ebenfalls zu einer signifikanten Senkung der PSGL-1-Abspaltung (Abb. 32 f). Durch N-Ethylmaleimid allein kam es zwar zu einer deutlichen Abnahme der PSGL-1-Fluoreszenz (Abb. 32 e), die weitere Prozessierung von PSGL-1 durch die gesuchte Protease wurde aber in Abhängigkeit von der Konzentration fast vollständig verhindert (Abb. 32 f). Auch wenn mit NEM ein Cysteinprotease-Inhibitor wirksam war, deuteten die Ergebnisse insgesamt darauf hin, dass PSGL-1 vermutlich durch eine Metalloprotease (z.B. MMP oder ADAM) abgespalten wird.

Phosphoramidon ist ein schwacher Inhibitor von Collagenasen (MMP-1, -8, -13, -18) und hatte keinen Einfluss auf die Abspaltung von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen (Abb. 32 b).

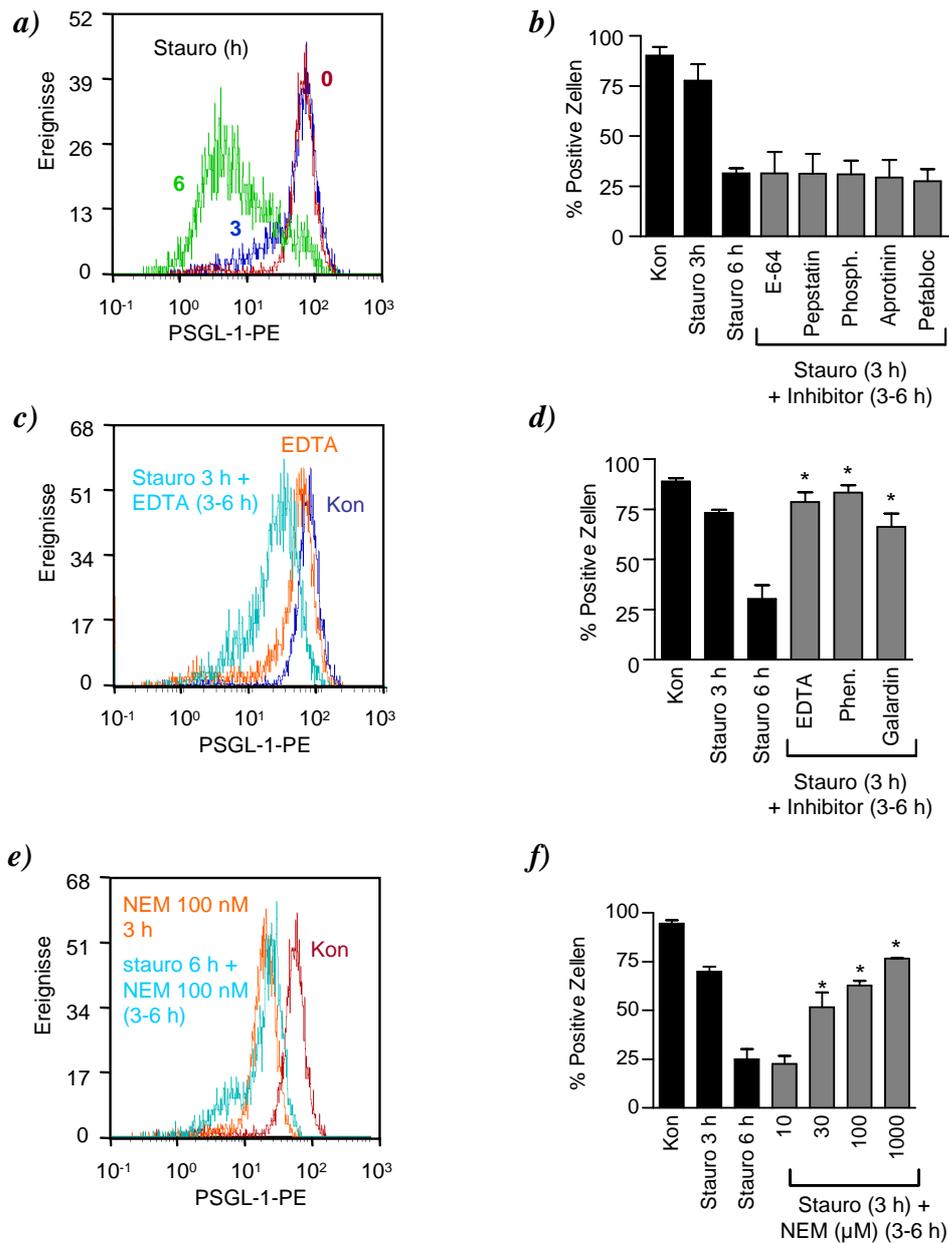


Abb. 32:

Effekte von Protease-Inhibitoren auf die Abspaltung von PSGL-1. **a)** Effekt von Staurosporin (Stauro, 2 μ M). **b)** Effekt von E-64 (10 μ M), Pepstatin A (2 μ M), Phosphoramidon (Phosph., 10 μ M), Aprotinin (0,3 μ M) und Pefabloc (250 μ M). **c)** Effekt einzelner Substanzen auf die PSGL-1-Fluoreszenz am Beispiel EDTA (10 mM, 3 h). **d)** Effekt von EDTA (10 mM), Phenanthrolin (Phen., 5 mM) und Galardin (10 μ M). **e)** Verminderung der PSGL-1-Expression durch N-Ethylmaleimid (NEM, 100 nM). **f)** Hemmung der PSGL-1-Abspaltung durch NEM in Abhängigkeit von der Konzentration. Repräsentative Originalhistogramme und quantitative Auswertung aus n = 6 Experimenten. *, p < 0,05 vs. Kontrolle.

Weil Phosphoramidon als schwacher Inhibitor von Collagenasen keinen Einfluss auf die Abspaltung von PSGL-1 hatte, wurde zunächst eine Zymographie durchgeführt. Eine Zymographie dient dem Aktivitätsnachweis von Gelatinasen.

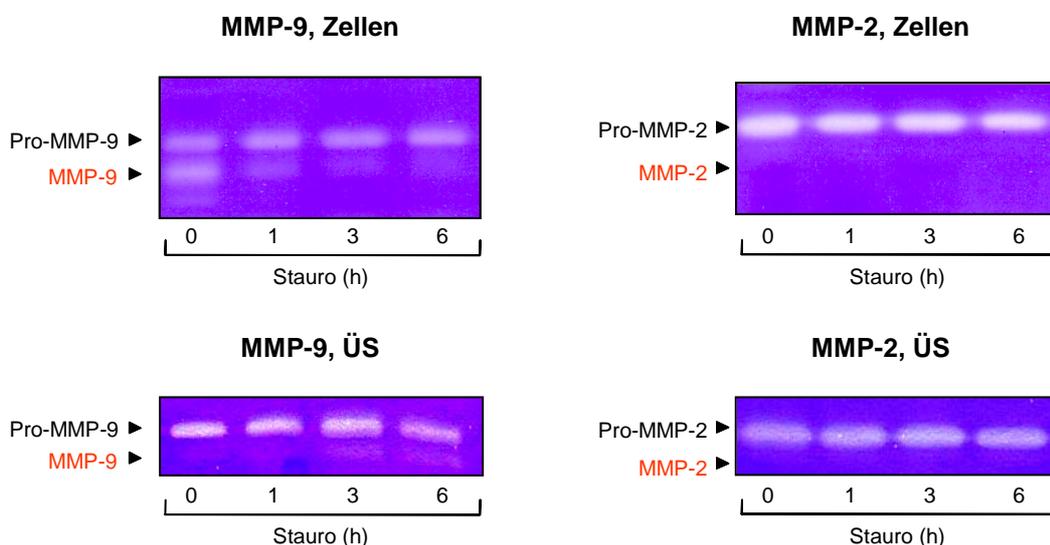


Abb. 33:

Zymographie, Nachweis der Gelatinasen MMP-2 und -9 in Zelllysaten (Zellen) und zellfreien Überständen (ÜS) nach Inkubation mit Staurosporin (Stauro, 2 μ M). Rot = aktive Form der jeweiligen MMP. Repräsentative Darstellung aus n = 3 Experimenten.

Durch Induktion der Apoptose kam es in den Zellen zu einer Abnahme der aktiven Form der MMP-9, die MMP-2 blieb unverändert inaktiv (Abb. 33). In den Zellüberständen kam es zu einem leichten Anstieg der proteolytischen Aktivität der MMP-9, die aktive Form der MMP-2 konnte nicht detektiert werden.

PSGL-1 wird vermutlich durch eine Protease abgespalten, die sich auf der Oberfläche der Zellen befindet. Da die aktive Form der MMP-9 in den Zelllysaten jedoch herabreguliert wurde, galt eine Beteiligung der MMP-9 an der Herabregulation von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen als unwahrscheinlich. Die Zymographie-Daten zeigten außerdem, dass eine Beteiligung der MMP-2 an der Abspaltung von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen ebenfalls unwahrscheinlich war.

In den nachfolgenden Versuchen wurden verschiedene spezifische Inhibitoren (Hydroxamsäure-Derivate) von Matrix-Metallo-Proteasen (MMP) untersucht. Bei diesen Versuchen wurden die Konzentrationen der Inhibitoren so gewählt, dass sie etwa dem 3-fachen IC_{50} -Wert entsprachen (Abb. 34). Die Proteine TIMP-1 (Tissue inhibitor of metalloproteinases-1) und TIMP-3 sind ebenfalls MMP-Inhibitoren und wurden in sehr hohen Konzentrationen eingesetzt (TIMP-1 bzw. TIMP-3 inhibieren eine Vielzahl von MMP in einem Konzentrationsbereich von

nmol/l bzw. ng/ml). Keiner dieser Inhibitoren konnte bei diesen Konzentrationen die Apoptose-induzierte Abspaltung von PSGL-1 verhindern (Abb. 34).

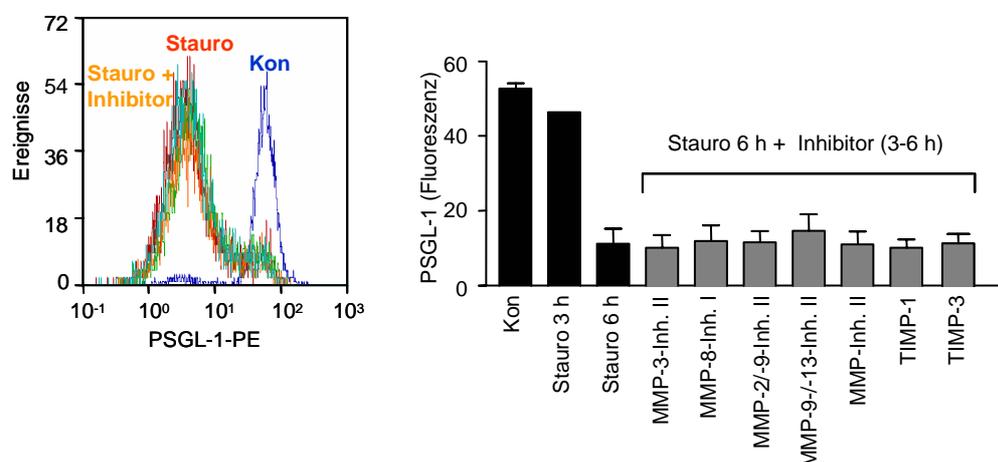


Abb. 34:

Einfluss verschiedener MMP-Inhibitoren auf die PSGL-1-Abspaltung unter apoptotischen Bedingungen. Eingesetzte Inhibitoren (Inhibitor): MMP-3-Inh. II (300 nM), MMP-8-Inh. I (10 nM), MMP-2/-9-Inh. II (50 nM), MMP-9/-13-Inh. II (3 nM), MMP-Inh. II (100 nM), TIMP-1 (1 μ M), TIMP-3 (3 μ g/ml). Repräsentative Originalhistogramme und quantitative Auswertung von n = 4 Experimenten. *, p < 0,05 vs. Kontrolle.

Die fehlende Wirksamkeit der spezifischen Inhibitoren der MMP-2 und -9 (MMP-2/-9-Inhibitor und MMP-9/-13-Inhibitor) bestätigte die Schlussfolgerungen aus den Zymographieversuchen, dass weder MMP-2 noch MMP-9 an der Abspaltung von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen beteiligt sind.

Interessanterweise kam es bei Einsatz der verschiedenen MMP-Inhibitoren auf Hydroxamsäure-Basis in unspezifisch hohen Konzentrationen (> 10 x IC₅₀) zu einer Hemmung der Apoptose-induzierten Abspaltung von PSGL-1 (Abb. 35). Diese Daten stimmten daher mit der Hypothese überein, dass die Protease, die für die Abspaltung von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen verantwortlich ist, aus der MMP- oder der ADAM-Familie stammen musste.

Aus dem Spektrum der bisher eingesetzten Inhibitoren erschien es als unwahrscheinlich, dass die MMP-1, -2, -3, -8, -9 oder -13 an der Abspaltung von PSGL-1 bei der Apoptose beteiligt waren.

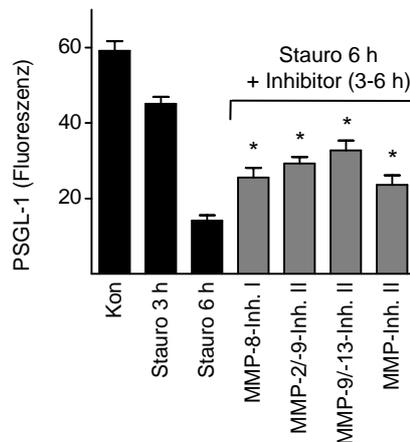


Abb. 35:

Einfluss verschiedener MMP-Inhibitoren in unspezifisch hohen Konzentrationen auf die PSGL-1-Abspaltung. MMP-8-Inh. I (100 nM), MMP-2/-9-Inh. II (1 μ M), MMP-9/-13-Inh. II (1 μ M), MMP-Inh. II (1 μ M). Quantitative Auswertung von n = 3 Experimenten. *, p < 0,05 vs. Kontrolle.

ADAM-10 und -17 sind membrangebundene Proteasen, die bei der Abspaltung einer Vielzahl von Zelloberflächen-Proteinen eine Rolle spielen (Ludwig et al., 2005). ADAM-10 ist in der Lage, PSGL-1 von der Zelloberfläche abzuspalten (Lichtenthaler et al., 2003). ADAM-10 kann durch TIMP-1 und TIMP-3 gehemmt werden, während ADAM-17 nur durch TIMP-3 gehemmt wird. In vorangegangenen Versuchen (Abb. 34) hatte weder Staurosporin-induzierte Abspaltung von PSGL-1. Daher konnte eine Beteiligung von ADAM-10 und -17 bei der Abspaltung von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen ausgeschlossen werden. In Kontrollversuchen wurde der Einfluss von Anti-ADAM-10- und Anti-ADAM-17-Antikörpern auf die Abspaltung von PSGL-1 sowie die Regulation von ADAM-10 und -17 auf Proteinebene bei Apoptose mittels Western-Blot untersucht.

Der Anti-ADAM-10-Antikörper war gegen das katalytische Zentrum der ADAM-10 gerichtet. Interessanterweise konnten beide aktiven Formen der ADAM-10 in Zelllysaten nicht-apoptotischer und apoptotischer Zellen detektiert werden (Abb. 36 a). Die Inkubation von apoptotischen U937-Zellen mit dem Anti-ADAM-10-Antikörper führte jedoch zu keiner Hemmung der Apoptose-induzierten Abspaltung von PSGL-1 (Abb. 36 c). Das bedeutet, dass eine Beteiligung von ADAM-10 an der Apoptose-induzierten Herabregulation von PSGL-1 unwahrscheinlich war. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass weder TIMP-1 noch TIMP-3 einen Hemmeffekt auf die Abspaltung von PSGL-1 hatten.

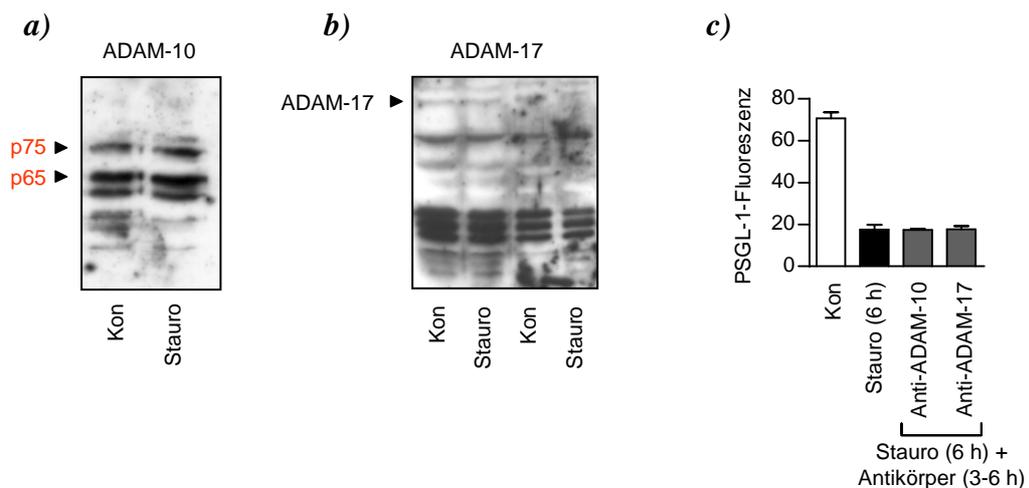


Abb. 36:

Regulation von ADAM-10 und -17 auf Proteinebene und Einfluss von Anti-ADAM-10- und -17-Antikörpern auf die Abspaltung von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen. Die Apoptose wurde durch Staurosporin (Stauro, 2 μ M) induziert. *a)*, *b)* Western-Blot. Kontrolle = Kon, Staurosporin = Stauro (2 μ M, 6 h). Rot = Größe der aktiven Enzymform. *c)* Einfluss von Anti-ADAM-10- und -17-Antikörpern (Konz. 1:50, 3 h) auf die Abspaltung von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen (Stauro, 2 μ M). Originalabbildung und quantitative Auswertung von $n = 2$ Experimenten.

Das Expressionsniveau von ADAM-17 war in den U937-Zellen sehr gering (Abb. 36 b). Nur nach sehr langer Exposition des Röntgenfilms konnte eine dünne Bande bei ca. 80 kD detektiert werden, die ADAM-17 entsprach. Die kleineren Banden bei ca. 40 kD waren vermutlich unspezifische Banden. Ein Unterschied zwischen den Banden apoptotischer und nicht-apoptotischer Zellen konnte in diesem Versuch nicht detektiert werden. Die Inkubation der Zellen mit einem Anti-ADAM-17-Antikörper führte zu keiner Hemmung der Staurosporin-induzierten PSGL-1-Abspaltung (Abb. 36 c). Das bedeutet, dass auch eine Beteiligung von ADAM-17 an der PSGL-1-Abspaltung unter apoptotischen Bedingungen unwahrscheinlich war.

Die Protease ADAM-9 wird durch TIMP-Proteine nicht inhibiert (Amour et al. 2002) Die aktive ADAM-9 ist eine membrangebundene Protease, für die eine Beteiligung an der Abspaltung von HB-EGF (Izumi et al., 1998) beschrieben wurde. Weil ADAM-9 durch den Metalloprotease-Inhibitor TAPI-0 inhibiert werden kann, wurden mögliche Effekte dieses Inhibitors auf die Apoptose-induzierte Abspaltung von PSGL-1 untersucht.

Die Inkubation apoptotischer Zellen mit TAPI-0 (100-300 nM) führte zu einer signifikanten Hemmung der Abspaltung von PSGL-1 (Abb. 37 a).

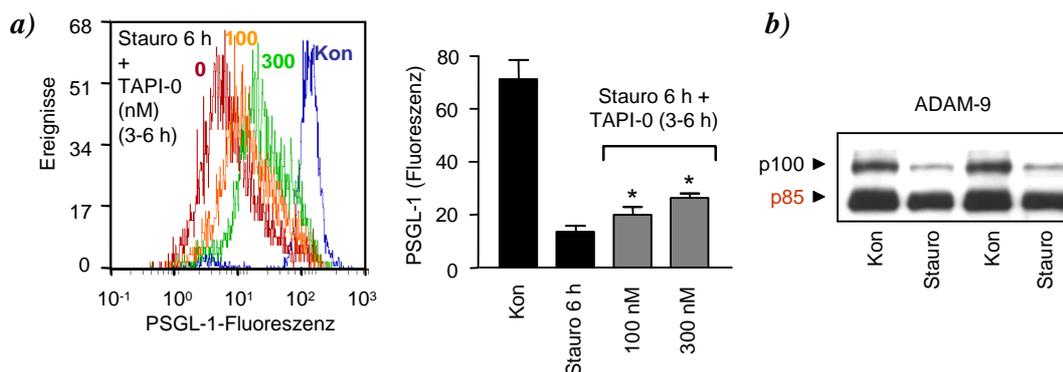


Abb. 37:

Effekte von ADAM-9 auf die Abspaltung von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen. Die Apoptose wurde durch Staurosporin (Stauro, 2 μ M) induziert. Kontrolle = Kon. **a)** Durchflusszytometrische Bestimmung der Effekte des Metalloprotease-Inhibitors TAPI-0 (100 nM, 300 nM). Repräsentative Originalhistogramme und quantitative Auswertung von n = 3 Experimenten. *, p < 0,05 vs. Kontrolle. **b)** Western-Blot. Regulation von ADAM-9 unter apoptotischen Bedingungen.

Die Protein-Expression von ADAM-9 wurde in nicht-apoptotischen und apoptotischen Zellen mittels Western-Blot untersucht. Interessanterweise konnte sowohl in Kontrollzellen als auch in apoptotischen Zellen die aktive Form (p85) von ADAM-9 detektiert werden (Abb. 37 b). Bei der Expression der inaktiven Form (p100) war eine Herabregulation in apoptotischen Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen zu erkennen. Das bedeutet, dass ADAM-9 bei der Abspaltung von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen beteiligt sein könnte.

Eine weitere Protease, die an der Herabregulation von PSGL-1 beteiligt sein könnte, war die membrangebundene Aspartatprotease BACE-1 (β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1). Lichtenthaler et al. (2003) haben eine Herabregulation von PSGL-1 durch BACE-1 beschrieben. Durch Inkubation der Zellen mit einem spezifischen Inhibitor der BACE-1 (BACE-1-Inhibitor IV) kam es zu keiner Hemmung der Apoptose-induzierten Abspaltung von PSGL-1 (Abb. 38). Der BACE-1-Inhibitor IV inhibiert BACE-1 bereits in nanomolaren Bereich (IC_{50} = 900 pM). Die bei diesen Versuchen eingesetzte Konzentration (1 μ M) war sehr hoch. Der fehlende Effekt des BACE-Inhibitors stimmte mit den Beobachtungen aus vorhergegangenen Versuchen überein, in denen der Aspartatprotease-Inhibitor Pepstatin A keine Wirkung auf die Abspaltung von PSGL-1 hatte (Abb. 32 b).

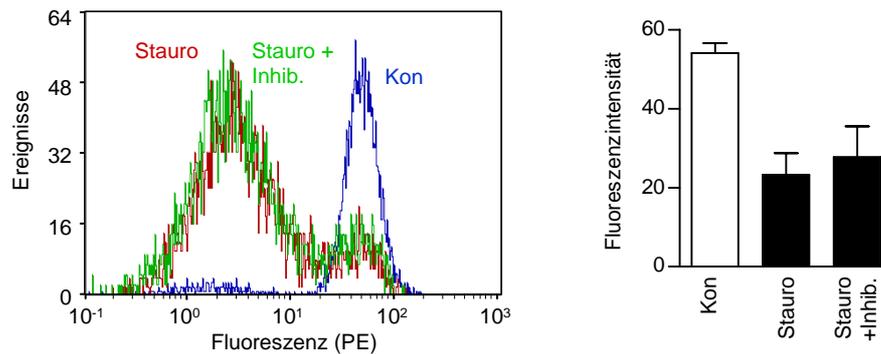


Abb. 38:

Einfluss des BACE-1-Inhibitor IV (Inhib., 1 μ M) auf die PSGL-1-Abspaltung unter apoptotischen Bedingungen. Repräsentative Originalhistogramme und quantitative Auswertung von n = 3 Experimenten.

Noch eine weitere Protease, die an der Abspaltung von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen beteiligt sein könnte, ist die Cysteinprotease Caspase-1. Die Peptidsequenz von PSGL-1 wurde mit Hilfe der Datenbank „Peptide Cutter“ (<http://www.expasy.org/tools/peptidecutter/>) analysiert. In der Datenbank sind die in Tab. 2 aufgelisteten Enzyme und Substanzen katalogisiert. Enzyme und Substanzen, die zu einer Spaltung von PSGL-1 führen können, sind rot markiert.

Die einzige Protease dieser Liste, die als Kandidat für die Abspaltung von PSGL-1 als wahrscheinlich erschien, war die Caspase-1. Die anderen Proteasen stammten entweder aus der Familie der Serinproteasen (z.B. Trypsin) oder Aspartatproteasen (z.B. Pepsin) und waren wegen der fehlenden Wirksamkeit der Inhibitoren dieser Familien (Abb. 32 b) unwahrscheinlich, oder aber es handelte sich um bakterielle Proteasen (z.B. Staphylokokken-Peptidase 1). Der Cysteinprotease-Inhibitor E-64 hatte zwar auch keinen Effekt auf die Abspaltung von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen, aber der Cysteinprotease-Inhibitor NEM führte zu einer fast vollständigen Hemmung der Herabregulation von PSGL-1 bei Apoptose. Daher wurde in einer weiteren Versuchsreihe der Einfluss der Cysteinprotease Caspase-1 untersucht.

Arg-C-Protease	Glutamyl-Endopeptidase
Asp-N-Endopeptidase	Granzym B
Caspase1	Hydroxylamin
Caspase2	Iodobenzoesäure
Caspase3	Lys-C
Caspase4	Lys-N
Caspase5	NTCB (2-Nitro-5-thiocyanobenzoe- säure)
Caspase6	Pepsin (pH 1,3)
Caspase7	Pepsin (pH > 2)
Caspase8	Prolin-Endopeptidase
Caspase9	Proteinase K
Caspase10	Staphylokokken-Peptidase I
Chymotrypsin	Thermolysin
Clostripain (Clostridiopeptidase B)	Thrombin
Enterokinase	Trypsin
Factor Xa	
Ameisensäure	

Tab. 2:

Katalogisierte Substanzen und Enzyme der Datenbank „Peptide Cutter“. Rot = Spaltung von PSGL-1 in der extrazellulären Domäne, schwarz = keine Spaltung von PSGL-1.

Die Inkubation der U937-Zellen mit dem spezifischen Caspase-1-Inhibitor I konnte die Apoptose-induzierte Abspaltung von PSGL-1 nicht hemmen (Abb. 39 a). Bei Untersuchung der Caspase-1-Expression mittels Western-Blot konnte keine Regulation der Caspase-1 in apoptotischen Zellen im Vergleich zu nicht-apoptotischen Zellen detektiert werden (Abb. 39 b). Das bedeutet, dass die Caspase-1 wahrscheinlich nicht an der Abspaltung von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen beteiligt war.

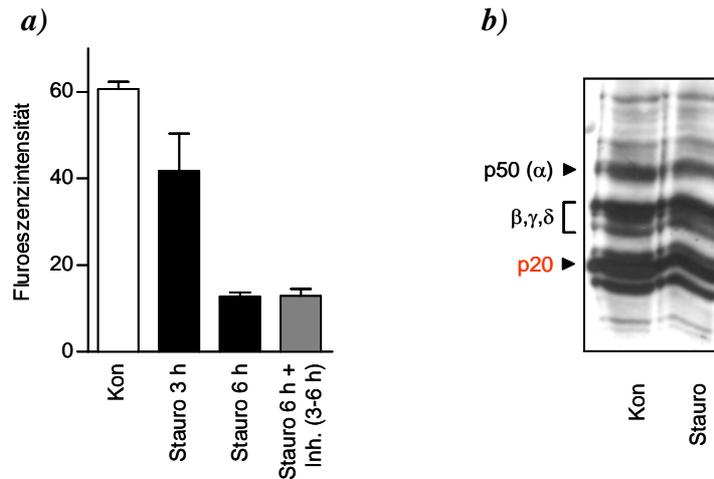


Abb. 39:

Einfluss der Caspase-1 auf die PSGL-1-Abspaltung unter apoptotischen Bedingungen. Die Apoptose wurde durch Staurosporin induziert (Stauro, 2 μ M). Kontrolle = Kon. **a)** Effekt des Caspase-1-Inhibitor I (Inh., 3 μ M) auf die Staurosporin-induzierte PSGL-1-Abspaltung. **b)** Nachweis der Caspase-1 mittels Western-Blot in Lysaten nicht-apoptotischer (Kon) und apoptotischer (Stauro, 2 μ M, 6 h) Zellen. Repräsentative Originalabbildung und quantitative Auswertung aus n = 3 Experimenten.

Zusammenfassend konnte aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass die Protease, die an der Abspaltung von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen beteiligt war, vermutlich aus der Familie der Metalloproteasen stammte. Die Protease konnte außerdem durch NEM inhibiert werden. Einen möglichen Kandidaten könnte ADAM-9 darstellen.

3.3.5 Zelluläre Kontrolle der P-Selectin Glycoprotein Ligand 1-Abspaltung bei Apoptose

Der Einfluss verschiedener Inhibitoren von Signaltransduktionswegen auf die Apoptose-induzierte PSGL-1-Abspaltung wurde in einer weiteren Versuchsreihe untersucht. Die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) ist ein wichtiger intrazellulärer Mechanismus bei der Abspaltung von Zelloberflächen-Proteinen (Dello Sbarba & Rovida, 2002). Da jedoch der PKC-Inhibitor Staurosporin zu einer vollständigen Herabregulation von PSGL-1 führte, erschien es unwahrscheinlich, dass über eine Aktivierung der PKC die Apoptose-induzierte Abspaltung von PSGL-1 reguliert wurde. Es gibt mehrere PKC-unabhängige Mechanismen, die bei der Abspaltung von Zelloberflächen-Proteinen eine Rolle spielen. Diese Mechanismen laufen unter Beteiligung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) oder Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) ab. Auch eine erhöhte intrazelluläre Ca^{++} -Konzentration kann zu einer Abspaltung von Proteinen der Zelloberfläche führen (Dello Sbarba & Rovida, 2002). Daher wurde als Inhibitor des MAPK-Weges PD98059 eingesetzt, als Inhibitor des p38-Weges SB202190. Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration wurde mittels BAPTA-AM unterdrückt. All diese Inhibitoren führten zu keiner Verminderung der PSGL-1-Abspaltung unter apoptotischen Bedingungen (Abb. 40). Interessanterweise führte die Inkubation der Kontrollzellen mit BAPTA-AM zu einer starken Senkung der PSGL-1-Fluoreszenz. Dieser Effekt könnte dadurch erklärt werden, dass BAPTA-AM evtl. selbst die Apoptose in U-937-Zellen induzierte und zu einer Abspaltung von PSGL-1 führte. Eine Regulation der PSGL-1-Abspaltung unter apoptotischen Bedingungen durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration galt daher als unwahrscheinlich.

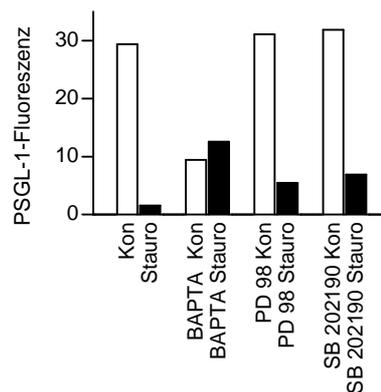


Abb. 40:

Durchflusszytometrische Bestimmung der PSGL-1-Expression nach Inhibition verschiedener Signaltransduktionswege. BAPTA-AM (30 μM), PD98059 (PD98, 30 μM), SB202190 (3 μM). Inhibitoren wurden dem Kulturmedium 30 Min. vor Induktion der Apoptose hinzugefügt. Die Apoptose wurde durch Staurosporin (Stauro, 2 μM) induziert. Kontrolle = Kon.

3.3.6 Funktion von P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 unter apoptotischen Bedingungen

PSGL-1 ist der spezifische Rezeptor für P-Selectin, das auf Endothelzellen und aktivierten Thrombozyten exprimiert wird. In einer weiteren Versuchsreihe sollte daher überprüft werden, welche funktionellen Konsequenzen die Apoptose-induzierte Herabregulation von PSGL-1 auf die Interaktion zwischen P-Selectin und PSGL-1 hat.

Dazu wurden in einem ersten Versuchsansatz U937-Zellen mit ruhenden Thrombozyten bzw. mit aktivierten Thrombozyten (30 μ M PAR-1-AP) unter statischen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde die Aggregatbildung zwischen U937-Zellen und Thrombozyten durchflusszytometrisch analysiert. U937-Zellen wurden durch Anti-CD45-Antikörper detektiert, Thrombozyten durch Anti-CD61-Antikörper. Bei Inkubation der U937-Zellen mit unstimulierten Thrombozyten konnten keine Aggregate zwischen den beiden Zelltypen gemessen werden. Wurden nicht-apoptotische U937-Zellen hingegen mit aktivierten Thrombozyten inkubiert, so konnte eine deutliche Aggregatbildung beobachtet werden. Bei der Inkubation apoptotischer U937-Zellen mit aktivierten Thrombozyten blieb die Aggregatbildung vollkommen aus (Abb. 41 a).

Im zweiten Versuchsansatz wurden apoptotische und nicht-apoptotische U937-Zellen mit Calcein-AM fluoreszenzmarkiert und in einer Parallelfusskammer über Endothelzellen perfundiert. Bei Perfusion der Kontrollzellen kam es zu einer Anheftung einer Vielzahl von Zellen an die Endothelzellen, während apoptotische Zellen unter diesen Versuchsbedingungen nicht an die Endothelzellen adhärten (Abb. 41 b).

Die Versuche zeigten, dass die Herabregulation von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen zu einem völligen Funktionsverlust des Proteins führt.

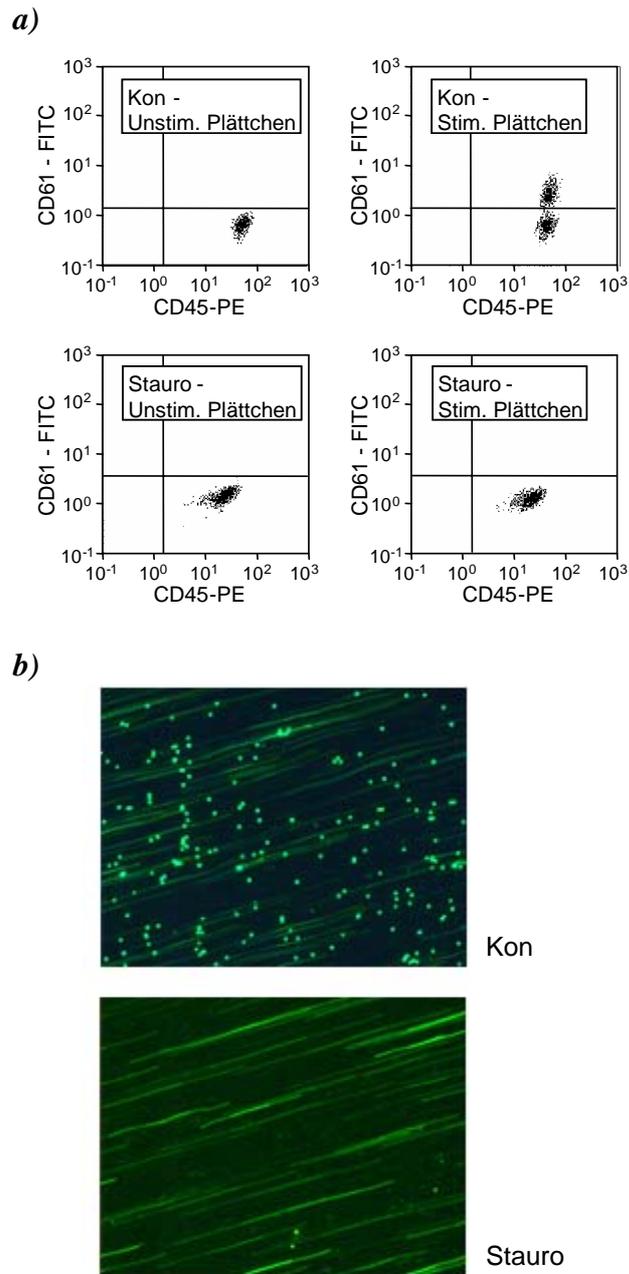


Abb. 41:

Bestimmung der PSGL-1-Funktion unter apoptotischen Bedingungen. **a)** Interaktion zwischen nicht-apoptotischen (Kon) und apoptotischen (Stauro) U937-Zellen (CD45-PE) und Thrombozyten (CD61-FITC). Linke Seite, unstimulierte Thrombozyten; rechte Seite, stimulierte Thrombozyten (PAR-1-AP, 30 μ M, 15 Min.). **b)** Adhäsion nicht-apoptotischer (Kon) und apoptotischer (Stauro) U937-Zellen (grün) an HUVEC unter Flussbedingungen (125 s^{-1} , 0,5 ml/min, 10 Min.).

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die prokoagulatorische Aktivität von Mikropartikeln aus U937-Zellen und SMC untersucht.

Insbesondere wurden die Mechanismen untersucht, durch die SMC zu einer bedeutenden pathophysiologischen Quelle für zirkulierenden TF werden können.

Darüber hinaus wurde systematisch untersucht, inwiefern die Apoptose die Thrombogenität apoptotischer Mikropartikel im Vergleich zu nicht-apoptotischen Mikropartikeln beeinflusst und welche Mechanismen dafür verantwortlich sind.

4.1 Freisetzung von Tissue Factor aus humanen glatten Gefäßmuskelzellen

In dieser Arbeit wurde die Freisetzung von TF aus SMC unter Flussbedingungen untersucht. Verglichen mit der Freisetzung von TF unter statischen Bedingungen kam es unter Flussbedingungen zu einer schnellen Freisetzung von TF-positiven Mikropartikeln. Die Freisetzung von TF war jedoch transient und bereits nach etwa 10 Minuten wurde nur noch eine basale prokoagulatorische Aktivität im Perfusat gemessen. Nach einer Inkubation bereits perfundierter Zellen unter statischen Bedingungen kam es zu einer Reexposition von freisetzbarem TF.

Bisher ging man davon aus, dass die meisten TF-haltigen Mikropartikel in der Zirkulation aus Leukozyten stammen. Das liegt möglicherweise daran, dass die Identifikation leukozytärer Mikropartikel anhand spezifischer Oberflächenmarker erfolgen kann. Ein gleichwertiger Nachweis zur Identifizierung von Mikropartikeln aus SMC ist nicht möglich, da für diese Zellart keine spezifischen Oberflächenmarker existieren. Die Arbeit von Schechter et al. (2000) hat zwar die Freisetzung von TF aus SMC zeigen können, allerdings erfolgt die Freisetzung langsam über einen Zeitraum von Stunden bis Tagen. Ein schneller Anstieg von zirkulierendem TF, wie er nach PTCA beobachtet wird, kann daher durch diese langsame Freisetzung nicht erklärt werden. Eine Freisetzung von TF aus Monozyten kann unter diesen Bedingungen ebenfalls nicht erklärt werden, da Monozyten erst nach mehrstündiger Stimulation (z.B. mit LPS) TF produzieren (Eilertsen & Osterud, 2004). In klinischen Situationen, die mit einer Endothelschädigung einhergehen, kommen SMC in direkten Kontakt mit der Blutbahn. Eine schnelle Freisetzung von TF aus SMC unter diesen Bedingungen könnte eine Erklärung für den schnellen Anstieg des TF-Plasmaspiegels sein. Interessanterweise deutete eine Arbeit an isolierten Arterien der Ratte darauf hin, dass Scherstress für eine schnelle Freisetzung von TF aus der Gefäßwand verantwortlich sein könnte (Giesen et al., 2000).

Daher wurde eine systematische Untersuchung des Einflusses von Fluss auf die TF-Freisetzung aus SMC durchgeführt. In Übereinstimmung mit der Arbeit von

Schechter et al. (2000) konnte auch hier eine langsame (Stunden) Freisetzung von prokoagulatorischer Aktivität unter statischen Bedingungen beobachtet werden. Beim Vergleich der Freisetzung von prokoagulatorischer Aktivität aus SMC unter statischen Bedingungen mit der unter Flussbedingungen konnte innerhalb weniger Minuten ein deutlicher Anstieg der prokoagulatorischen Aktivität im Perfusat, verglichen mit dem Zellüberstand, gezeigt werden. Mittels Durchflusszytometrie, Western-Blot und mit inhibierenden Antikörpern wurde nachgewiesen, dass die prokoagulatorische Aktivität in diesen Versuchen auf TF zurückzuführen war. Die TF-Freisetzung korrelierte mit der Scherrate und war bei Scherraten, wie sie im arteriellen System vorliegen (ca. 1500 s^{-1}), am höchsten. Bei einer längeren Perfusion der SMC nahm die TF-Freisetzung schnell ab, nach 10 Min. wurde nur noch eine geringe prokoagulatorische Aktivität des Perfusats gemessen. Diese Beobachtungen sind konform mit der Arbeit von Giesen et al. (2000), bei der eine schnelle, transiente Freisetzung von TF nach Endothelverletzung gezeigt wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen nach einer 15-minütigen Perfusion mittels Western-Blot und Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Weder hinsichtlich der TF-Expression in der Zelle noch der TF-Expression an der Zelloberfläche konnte ein Unterschied zwischen perfundierten und nicht-perfundierten Zellen gemessen werden. Anscheinend hängt die transiente Freisetzung von TF nur bedingt mit der Expression dieses Proteins an der Zelloberfläche zusammen und nur eine kleine Fraktion des TF an der Zelloberfläche kann nach Einwirkung von Scherstress von der Zelloberfläche freigesetzt werden. Die Mechanismen, die dazu führen, dass TF von der Oberfläche freisetzbar ist, sind weitgehend unklar. Klassische Mechanismen der Mikropartikelfreisetzung scheinen bei SMC jedoch keine Rolle zu spielen. Normalerweise unterliegt die Mikropartikelfreisetzung einem geregelten Mechanismus: negativ geladene Phospholipide werden durch eine membranständige Translokase unter ATP-Verbrauch zur zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran transportiert. Unter dem Einfluss einer erhöhten intrazellulären Ca^{++} -Konzentration wird diese Translokase jedoch gehemmt und Calpain aktiviert. Durch den Verlust der Membranasymmetrie und die Calpain-induzierte lokale Degradierung des Zytoskeletts kommt es zu einer Sezernierung von Mikropartikeln (Diamant et al., 2004; Zwaal & Schroit, 1997). Zellaktivierung und Apoptose gelten als die wichtigsten Mechanismen zur Aktivierung dieses Mikropartikelfreisetzungsweges (Freyssinet, 2003). Da die Perfusionen nur über einen kurzen Zeitraum durchgeführt wurden (1-2 h) und selbst der Apoptose-Induktor Staurosporin in diesem Zeitraum keine Apoptose in SMC induzieren konnte, gilt die Apoptose als Mechanismus für die Freisetzung von TF unter den gewählten Versuchsbedingungen als sehr unwahrscheinlich.

Iloprost als Inhibitor der Zellaktivierung, der Calpain-Inhibitor ALLN und der Ca^{++} -Chelator BAPTA-AM vermochten weder die Mikropartikel-Freisetzung noch die -Reexposition zu verhindern. Diese Befunde unterstützen die Hypothese von Schechter et al. (2000), dass es sich bei der Freisetzung TF-haltiger Mikropartikel aus SMC um eine konstitutive Eigenschaft dieser Zellen handelt. Möglicherweise werden unter Flussbedingungen TF-haltige Mikropartikel durch die einwirkenden mechanischen Kräfte abgeschnürt, ohne dass intrazelluläre Mechanismen involviert sind. Für einen solchen Freisetzungsmechanismus spricht

die beobachtete Abhängigkeit der Mikropartikel-Freisetzung von der Scherrate. Auch wenn die Mechanismen der Mikropartikel-Freisetzung in der vorliegenden Arbeit nicht definitiv geklärt werden konnten, so haben diese Experimente gezeigt, dass SMC zu einer pathophysiologisch relevanten Quelle für TF werden können, sobald sie in direkten Kontakt mit der Blutbahn gelangen.

Die schnelle Reexposition von freisetzbarem TF kann bei zyklischen Flussvariationen eine wichtige Rolle spielen: bedingt durch operative Eingriffe zur Revaskularisierung des Herzens (Katheterintervention, Bypasschirurgie) kann es zu einer Verletzung der Gefäßwand kommen. Dies führt dann sehr wahrscheinlich zu einer schnellen Freisetzung von TF in die Blutbahn. Gleichzeitig kann es zu einer Adhäsion von Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand kommen. Der Thrombozytenthrombus vergrößert sich und kann zu einer temporären Stenose eines Gefäßes führen. Während dieser Zeit könnte es nach den beobachteten Ergebnissen dieser Arbeit zu einer Reexposition von freisetzbarem TF kommen. Dieser Thrombus ist jedoch nicht stabil und wird häufig in die Blutbahn fortgeschwemmt (Folts, 1991). Dies führt zwar einerseits zu einer Wiederherstellung des Blutflusses, andererseits kommt es durch den abreißenen Thrombus zu einer erneuten Exposition von SMC hin zur Blutbahn. Dementsprechend kann es dann wieder zu einer Freisetzung von TF-haltigen Mikropartikeln aus SMC in die Blutbahn kommen. Durch die häufige Wiederholung solcher Mechanismen (temporäre Stenose und nachfolgende Wiederherstellung des Blutflusses) können TF-haltige Mikropartikel aus SMC in der Zirkulation akkumulieren. In der Folge kann TF von der luminalen Seite in Thromben akkumulieren und so zu einer Initiierung der Blutgerinnung beitragen. Durch die Thrombin- und Fibrinbildung wird der Thrombus stabilisiert. Somit kann es schließlich zur Bildung stabiler okklusiver Thromben kommen.

4.2 Regulation der prokoagulatorischen Aktivität bei Apoptose

Der azelluläre Kern atherosklerotischer Plaques weist die höchste prokoagulatorische Aktivität der Plaques auf. Im azellulären Kern befindet sich eine Vielzahl von Mikropartikeln, die vermutlich aus apoptotischen Monozyten und apoptotischen SMC sezerniert wurden (Mallat et al., 1999). Nach einer Plaqueruptur kann es zu einer Freisetzung dieser Mikropartikel in die Zirkulation kommen. Obwohl bekannt ist, dass der azelluläre Kern der Plaques die höchste prokoagulatorische Aktivität aufweist, gibt es bisher keinen systematischen Vergleich zwischen Mikropartikeln, die aus nicht-apoptotischen und apoptotischen Zellen sezerniert wurden. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Apoptose auf die Thrombogenität nicht-apoptotischer und apoptotischer Mikropartikel untersucht.

Zunächst wurde der Effekt der Apoptose auf die Mikropartikel aus SMC untersucht. Proteinbestimmungen isolierter Mikropartikel haben gezeigt, dass apoptotische Zellen etwa gleich viele Mikropartikel sezernieren wie nicht-apoptotische Zellen. In Western-Blot-Analysen wurde jedoch etwa doppelt so viel TF in den Mikropartikeln apoptotischer Zellen wie in denen nicht-apoptotischer Zellen detektiert. Das bedeutet, dass die Mikropartikel apoptotischer Zellen vermutlich mehr TF pro Mikropartikel exprimieren. Bei den funktionellen Messungen zeigten die Mikropartikel apoptotischer Zellen eine deutlich höhere prokoagulatorische Aktivität als die Mikropartikel nicht-apoptotischer Zellen. Die erhöhte Thrombogenität der apoptotischen Mikropartikel könnte durch die erhöhte Expression von TF in den Mikropartikeln erklärt werden. Dies konnte auch zunächst bei der durchflusszytometrischen Analyse nicht-apoptotischer und apoptotischer U937-Zellen bestätigt werden: analog zu den Mikropartikeln aus SMC, die durch Apoptose eine höhere TF-Expression pro Mikropartikel aufwiesen, konnte eine erhöhte TF-Expression auf apoptotischen U937-Zellen im Vergleich zu nicht-apoptotischen U937-Zellen gemessen werden. In funktionellen Messungen zeigten apoptotische U937-Zellen im Vergleich zu nicht-apoptotischen Zellen ebenfalls eine deutlich erhöhte prokoagulatorische Aktivität. Zusätzlich war auf apoptotischen U937-Zellen die Expression negativ geladener Phospholipide ebenfalls erhöht. Es ist bekannt, dass die Apoptose zu einer vermehrten Expression von TF und negativ geladener Phospholipide führt (Wang et al., 2001). Insofern war die beschriebene Beobachtung nicht überraschend. Der Einschluss von TF in Membraneinstülpungen, in den sogenannten Caveolae, führt zu einer erniedrigten Aktivität des Proteins (Mulder et al., 1996). Durch den Untergang der Membranasymmetrie während der Apoptose kann es zur Präsentation negativ geladener Phospholipide an der Zelloberfläche kommen, ebenso zu einer Ausstülpung der Membraneinschlüsse. In der Folge kommt es dann zu einer gleichzeitigen Expression von TF und negativ geladenen Phospholipiden auf der Zelloberfläche. Es ist bekannt, dass die Expression negativ geladener Phospholipide (v.a. Phosphatidylserin) in räumlicher Nähe zu TF zu einer erhöhten Aktivität dieses Proteins führt (Kunzelmann-Marche et al., 2000). Außerdem ist die Expression negativ geladener Phospholipide auf der Zelloberfläche von Thrombin- und Kollagen-aktivierten Thrombozyten

notwendig, damit die Blutgerinnung mit maximaler Geschwindigkeit ablaufen kann (Szasz & Dale, 2003).

Durch die simultane Expression von TF und negativ geladenen Phospholipiden kann also eine erhöhte Thrombogenität apoptotischer Zellen im Vergleich zu nicht-apoptotischen Zellen durchaus erklärt werden. Die Expression negativ geladener Phospholipide hatte aber vermutlich einen größeren Einfluss auf die Thrombogenität der Zellen als die Expression von TF. Der Zusatz von negativ geladenen Phospholipiden (Thrombozytenmembranen) führte zu einer starken Erhöhung der Thrombogenität der nicht-apoptotischen Zellen. Dies zeigte, dass die Expression negativ geladener Phospholipide auf den apoptotischen Zellen eine wichtige Rolle für die prokoagulatorische Aktivität spielte. Dies lässt sich dadurch erklären, dass TF prinzipiell sehr aktiv ist. TF-Quellen, bei denen keine TF-„Encryption“ vorliegt (z.B. rekombinanter TF), führen bereits im subpicomolaren Bereich zu einer schnellen Thrombinbildung. TF-Konzentrationen im niedrigen picomolaren Bereich sind bereits so stark prokoagulatorisch aktiv, dass eine weitere Steigerung der TF-Konzentration kaum noch die Thrombinbildung beschleunigt. Das heißt, dass die vorliegende TF-Konzentration weniger bedeutsam ist als die Regulation der TF-Funktion durch TF-„Encryption“. Die Expression negativ geladener Phospholipide stellt daher einen wahrscheinlichen Mechanismus für die Erhöhung der prokoagulatorischen Aktivität auf apoptotischen Zellen dar.

Bei der Analyse der zellulären Mikropartikel der U937-Zellen zeigten sich jedoch überraschende Befunde. Bei der Aktivitätsmessung der Mikropartikel der U937-Zellen ergab sich zunächst ein ähnliches Bild wie bei den vorherigen Messungen: die Mikropartikel apoptotischer Zellen wiesen eine deutlich höhere Aktivität auf als die Mikropartikel nicht-apoptotischer Zellen. Die Mikropartikel wurden dann hinsichtlich der Expression negativ geladener Phospholipide und TF untersucht. Anders als bei SMC konnte bei der durchflusszytometrischen Messung dieser Faktoren kein Unterschied zwischen apoptotischen und nicht-apoptotischen Mikropartikeln festgestellt werden. Hinsichtlich der Expression negativ geladener Phospholipide ist dies auch nicht überraschend. Mikropartikel werden häufig als Annexin-V-positive Ereignisse definiert (Biro et al., 2003; Diamant et al. 2004). Diese Definition ergibt sich aus dem klassischen Mechanismus der Mikropartikel-Freisetzung. Vor der Freisetzung der Mikropartikel erfolgt bei diesem Mechanismus ein Verlust der Membranasymmetrie. Daher kommt es meist zu einer Expression negativ geladener Phospholipide auf der Oberfläche von Mikropartikeln.

Ein geringer Unterschied zwischen den Mikropartikeln apoptotischer und nicht-apoptotischer Zellen bestand in der Anzahl der sezernierten Mikropartikel. Die Anzahl der Mikropartikel war bei den apoptotischen Proben leicht erhöht (um ca. 20%). Daher wurde in Kontrollversuchen die Menge der Mikropartikel in den Zellüberständen apoptotischer und nicht-apoptotischer Zellen auf die gleiche Anzahl eingestellt. Bei nachfolgenden ETP-Messungen zeigten die Überstände apoptotischer Zellen weiterhin eine signifikant erhöhte prokoagulatorische

Aktivität. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die Anzahl der Mikropartikel die deutlichen Unterschiede hinsichtlich der Thrombogenität erklärt.

Aus diesen Ergebnissen kann jedoch gefolgert werden, dass andere Eigenschaften als die Expression von TF und die Präsentation negativ geladener Phospholipide die prokoagulatorische Aktivität der monozytären Mikropartikel determinieren. Bereits in vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Expression negativ geladener Phospholipide nicht der einzige Mechanismus zur Aktivierung von TF sein kann: eine Aktivierung von Monozyten und Fibroblasten mit dem Calcium-Ionophor A23187 führte zu einem starken Anstieg der prokoagulatorischen Aktivität (Wolberg et al., 1999). Die Inkubation dieser Zellen mit sättigenden Annexin-V-Konzentrationen müsste zu einer vollständigen Hemmung der A23187-induzierten vermehrten prokoagulatorischen Aktivität führen, weil alle negativ geladenen Phospholipide quantitativ gebunden werden. In der Arbeit von Wolberg et al. (1999) aber war die prokoagulatorische Aktivität in A23187-stimulierten und mit Annexin-V-inkubierten Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen immer noch ca. 5-fach erhöht. Es muss also neben der Expression von negativ geladenen Phospholipiden noch andere Mechanismen geben, die zu einer erhöhten prokoagulatorischen Aktivität führen.

In der eigenen Arbeit wurde bei der Analyse der Mikropartikel nicht-apoptotischer und apoptotischer U937-Zellen mittels Western-Blot zusätzlich zu der 47 kD großen eine etwa 27 kD große Bande mit einem Anti-TF-Antikörper detektiert. Die 47 kD große Bande könnte der vollständig glykosylierten Form von TF entsprechen, die 27 kD große Bande der unglykosylierten Form von TF. Es ist bekannt, dass diese Form funktionell aktiv ist. Es ist jedoch bisher nicht bekannt, ob die posttranslationale Glykosylierung zu einer Verminderung der prokoagulatorischen Aktivität führt. Die 27 kD große Bande, die möglicherweise unglykosyliertem TF entspricht, könnte in diesem Fall die erhöhte prokoagulatorische Aktivität der apoptotischen Mikropartikel zumindest theoretisch erklären. Alternativ könnte diese Bande auch alternativ gespliceten TF (asTF) darstellen. Bei asTF fehlt die transmembranäre Domäne, so dass dieses Protein eigentlich löslich ist. Es ist bisher nicht beschrieben worden, ob asTF möglicherweise in einer Mikropartikel-gebundenen Form existiert. Es wäre jedoch vorstellbar, dass asTF über eine unspezifische Bindung an die Oberfläche der Mikropartikel bindet und daher in den Mikropartikeln nachzuweisen war.

In der Literatur gibt weitere Hinweise darauf, dass andere Mechanismen als die Expression negativ geladener Phospholipide die prokoagulatorische Aktivität bestimmen könnten. Eine Arbeit von Brisset et al. (2003) hat gezeigt, dass aortale SMC der Ratte unter dem Einfluss des endogenen Apoptose-Induktors Fas-Ligand stark prokoagulatorische Mikropartikel in das Kulturmedium sezernieren. Die Autoren dieser Arbeit haben diese erhöhte Thrombogenität einem Ungleichgewicht zwischen der Sezernierung von TF und TFPI (Tissue factor pathway inhibitor) zugeschrieben. Während die Freisetzung von TFPI in der Arbeit von Brisset et al. (2003) unverändert blieb, stieg die Sezernierung von TF im Verlauf der Apoptose an.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher auch der Einfluss von TFPI auf die Aktivität der TF-haltigen Mikropartikel untersucht. Bei Versuchen mit TFPI-inhibierenden Antikörpern konnte in diesem System kein Einfluss des TFPI festgestellt werden. TFPI konnte zwar in Zellen detektiert werden, der Nachweis gelang jedoch nicht auf zellulären Mikropartikeln und im Zellüberstand. Diese Beobachtung ist konsistent mit Literaturdaten (McGee et al., 1994; Rana et al., 1988). Insgesamt muss der Einfluss von TFPI aus SMC und Makrophagen auf die Thrombogenität der aus diesen Zellen sezernierten Mikropartikel daher als unwahrscheinlich angesehen werden. Auch die Zelltyp-spezifische Expression von TFPI spricht gegen eine relevante Bedeutung dieses Inhibitors für die prokoagulatorische Aktivität monozytärer Mikropartikel. Die wichtigste Quelle für TFPI und zirkulierenden TFPI sind Endothelzellen; Monozyten und SMC dagegen produzieren selbst nach Stimulation mit Endotoxinen oder Serum nur geringe Mengen TFPI (Bajaj et al., 2001).

Einen weiteren möglichen Mechanismus für die Regulation der prokoagulatorischen Aktivität der Mikropartikel nicht-apoptotischer und apoptotischer Zellen stellt die Expression des „Glucose-regulated protein 78“ (GRP78) dar. Verschiedene Publikationen haben gezeigt, dass GRP78 die Prozessierung und Sekretion verschiedener Gerinnungsfaktoren beeinflussen kann (Pozza & Austin, 2005) und dass eine Überexpression von GRP78 die prokoagulatorische Aktivität verringert (Watson et al., 2003). Die letztgenannte Arbeit hat gezeigt, dass die Überexpression von GRP78 in einer humanen Blasenkrebs-Zelllinie (T24/83) und in humanen SMC der Aorta weder zu einer veränderten TF-Synthese geführt hat, noch dass es zu einer veränderten TF-Expression auf der Zelloberfläche gekommen ist. Es ist bekannt, dass TF durch Erhöhung der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration (z.B. durch Inkubation von Zellen mit dem Calcium-Ionophor A23187) aus einem inaktiven Zustand in einen aktiven überführt werden kann (Wolberg et al., 1999). Watson et al. (2003) haben vermutet, dass GRP78 als Ca^{++} -bindendes Protein durch Senkung der freien intrazellulären Ca^{++} -Konzentration zu einer Verminderung der Ca^{++} -induzierten TF-Aktivierung geführt hat. Neben der Expression von GRP78 im endoplasmatischen Retikulum konnte auch gezeigt werden, dass GRP78 auf der Zelloberfläche verschiedener Zelltypen exprimiert wird (Delpino & Castelli, 2002). Der Mechanismus der Translokation auf die Zelloberfläche muss jedoch noch aufgeklärt werden: GRP78 verfügt über eine C-terminale KDEL-Retentionssequenz, die durch Interaktion mit spezifischen KDEL-Rezeptoren in der Membran des endoplasmatischen Retikulums die Lokalisation verschiedener Proteine im endoplasmatischen Retikulum determiniert. Das in der Plasmamembran lokalisierte GRP78 verfügt jedoch immer noch über diese KDEL-Retentionssequenz. Daher ist unklar, wie GRP78 dem Retentionsmechanismus entkommen kann (Pozza & Austin, 2005).

Bhattacharjee et al. (2005) haben an ApoE^{-/-}-Mäusen gezeigt, dass GRP78 in murinen Endothelzellen und in murinen Monozyten auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Die Autoren haben anschließend den Effekt von GRP78 auf die LPS-stimulierte prokoagulatorische Aktivität in einer murinen Endothelzelllinie (bEND.3-Zellen) und einer murinen Makrophagen-artigen Zelllinie (RAW-

Zellen) untersucht. Antikörper gegen GRP78 führten zu einer Verdopplung der prokoagulatorischen Aktivität. Die Autoren konnten außerdem zeigen, dass TF durch eine direkte, physikalische Interaktion mit GRP78 inhibiert wird.

Der Nachweis von GRP78 in U937-Zellen mittels Western-Blot ergab eine Doppelbande. Die obere dieser Banden entsprach mit einem Molekulargewicht von 78 kD der erwarteten Größe von GRP78. Die untere Bande hatte ein Molekulargewicht von 73 kD (p73). GRP78 selbst wurde durch Induktion der Apoptose nicht reguliert. Die p73-Bande könnte ein Spaltprodukt von GRP78 darstellen. Die p73-Bande wurde durch die Apoptose zeitabhängig herabreguliert und diese Regulation korrelierte mit einer steigenden prokoagulatorischen Aktivität von U937-Zellen. So deuteten diese Ergebnisse zunächst darauf hin, dass die prokoagulatorische Aktivität durch die p73-Bande negativ reguliert sein könnte. In einer weiteren Versuchsreihe konnte jedoch gezeigt werden, dass die p73-Bande auch durch Behandlung der Zellen mit PMA herabreguliert wird. Allerdings führte die Inkubation der Zellen mit PMA nicht zu einer gesteigerten prokoagulatorischen Aktivität der Zellen. Dies zeigte, dass die p73-Bande wahrscheinlich keinen Einfluss auf die prokoagulatorische Aktivität hat. Schließlich konnte GRP78 auch nicht in zellulären Mikropartikeln nachgewiesen werden. Daher muss eine TF-„Encryption“ durch GRP78 als unwahrscheinlich angesehen werden.

Das bedeutet, dass die beiden wahrscheinlichsten Kandidaten (TFPI und GRP78), die zu einer partiellen Inaktivierung von TF auf nicht-apoptotischen Mikropartikeln hätten führen können, vermutlich nicht an einer Beeinflussung der prokoagulatorischen Aktivität beteiligt waren.

Als Fazit bleibt aber die Beobachtung bestehen, dass die Apoptose zu einer deutlichen Erhöhung der prokoagulatorischen Aktivität führt. Das bedeutet, dass es in Situationen, die mit einer Freisetzung apoptotischer Mikropartikel oder auch apoptotischer Zellen (z.B. nach Plaqueruptur) einhergehen, zu einer Freisetzung von hochprokoagulatorischem Plaquematerial kommen kann. Die funktionellen Messungen der apoptotischen Mikropartikel und apoptotischen Zellen zeigen, dass das Vorhandensein von zusätzlichen negativ geladenen Membranen nicht notwendig ist, um große Mengen Thrombin zu bilden. Die „Thrombinbildungsmaschinerie“ ist normalerweise auf aktivierten Thrombozyten lokalisiert. Die apoptotischen Zellen und Mikropartikel bieten aber eine ebenso geeignete Oberfläche, um eine schnelle Thrombinbildung zu fördern. Das bedeutet wiederum, dass eine effektive thrombozytenaggregationshemmende Wirkung nicht ausreichen würde, um nach der Plaqueruptur einen sicheren Schutz gegen thrombotische Gefäßverschlüsse zu bieten. Die Hemmung der Gerinnung durch TF-inhibierende Maßnahmen (vgl. Kap. 4.4) zusätzlich zu einer antikoagulatorischen Heparintherapie könnte einen wichtigen therapeutischen Ansatz bei Patienten mit instabiler Angina pectoris darstellen. Wenn die Mechanismen, die zu der erhöhten prokoagulatorischen Aktivität der apoptotischen Mikropartikel beitragen, identifiziert werden können, so würde auch die Hemmung dieser Mechanismen einen therapeutischen Ansatz zur Hemmung der prokoagulatorischen Aktivität darstellen.

Da anscheinend weder TFPI noch GRP78 an diesen Mechanismen beteiligt sind, wurde eine proteomische Analyse durchgeführt. Hierzu wurden Mikropartikel apoptotischer und nicht-apoptotischer U937-Zellen isoliert und mittels 2D-Gelelektrophorese analysiert. Membranen wurden untersucht, weil Oberflächen-Proteine für die prokoagulatorische Aktivität bei der Thrombolyse wichtig sind und weil Mikropartikel aus der Zelloberfläche abgeschnürt werden. Durch die Fluoreszenzfärbung konnten quantitative Unterschiede in der Expression einzelner Proteine gut erfasst werden. Ein solcher proteomischer Ansatz der Mikropartikelanalyse apoptotischer und nicht-apoptotischer Zellen ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden. Bei der Analyse der Plasmamembranen sind 15 unterschiedlich regulierte Protein-„Spots“ identifiziert worden. Die Analyse der Mikropartikel ergab sieben unterschiedlich regulierte Protein-„Spots“. Überraschenderweise war eine Vielzahl dieser Protein-„Spots“ in den Membranen und Mikropartikeln apoptotischer Zellen heraufreguliert.

Die Erwartung war ursprünglich, dass in den Membranen apoptotischer Zellen im Vergleich zu den Membranen der Kontrollzellen einige Proteine herabreguliert werden, ähnlich wie dies bei der unteren GRP78-Bande der Fall war.

Vorstellbar ist jedoch, dass die durch Apoptose vermeintlich heraufregulierten Proteine proteolytische Fragmente größerer Proteine darstellen. Während der Apoptose wird eine Reihe von Proteasen aktiviert, unter anderem Cysteinproteasen der Caspase-Familie und Matrix-Metalloproteinasen (Mannello et al., 2005), von denen bekannt ist, dass sie an der Prozessierung von Proteinen an der Zelloberfläche beteiligt sind. Unter dem Einfluss dieser und anderer Proteasen könnte es zu einem Verdau größerer Proteine kommen, deren Fragmente in den Gelen apoptotischer Proben als heraufregulierte Proteine erscheinen. Die massenspektrometrische (MALDI-TOF) Analyse der regulierten Proteine wird von Herrn Dr. T. Grosser durchgeführt werden, sobald die notwendige apparative Ausstattung im Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie vorhanden ist und stellt die Grundlage für ein Folgeprojekt dar.

4.3 Regulation von P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 bei Apoptose

Die Interaktion zwischen P-Selectin und PSGL-1 ist ein wichtiger Mechanismus, über den TF in wachsende Thromben eingebaut werden kann (Falati et al., 2003; del Conde et al., 2005). Mikropartikel aus apoptotischen Zellen wiesen bei ETP-Messungen in Gegenwart und Abwesenheit zusätzlicher negativ geladener Phospholipide eine größere prokoagulatorische Aktivität als nicht-apoptotische Mikropartikel auf. Eben weil auch eine größere prokoagulatorische Aktivität apoptotischer Mikropartikel in Gegenwart von Thrombozytenmembranen bestand, wurde untersucht, ob auf apoptotischen Mikropartikeln eine erhöhte Expression von PSGL-1 zu finden ist. PSGL-1 ist der wichtigste Rezeptor für P-Selectin. P-Selectin wird vor allem auf aktivierten Thrombozyten und aktivierten Endothelzellen exprimiert. PSGL-1 wird auf der Oberfläche aller Leukozyten exprimiert. Eine Rolle dieser beiden Interaktionspartner bei der Blutgerinnung wurde erstmals durch Palabrica et al. (1992) gezeigt: in einem Tiermodell wurden P-Selectin inhibierende Antikörper eingesetzt, die das Wachstum eines experimentell induzierten Thrombus verhindert haben. Falati et al. (2003) haben die Rolle von PSGL-1 bei der Akkumulation TF-positiver Mikropartikel in wachsende Thromben mit Hilfe von PSGL-1^{-/-} und P-Selectin^{-/-}-Mäusen untersucht. Die Autoren konnten zeigen, dass die Größe des Thrombus und die Fibrinbildung im Thrombus in beiden knockout-Modellen im Vergleich zum Wildtyp reduziert waren. Außerdem wurden in dieser Arbeit Mikropartikel, die aus einer monozytären Zelllinie (WEHI) nach Fluoreszenzmarkierung mit Calcein und Inkubation mit dem Calciumionophor A23187 generiert wurden, in Wildtyp- und P-Selectin^{-/-}-Mäuse injiziert. Nach Endothelverletzung akkumulierten diese Mikropartikel in den wachsenden Thromben der Wildtyp-Mäuse, jedoch nicht in denen der P-Selectin^{-/-}-Mäuse. Die Autoren haben damit eindrucksvoll gezeigt, dass die Interaktion zwischen PSGL-1 und P-Selectin wichtig für das Thrombuswachstum ist und haben aus ihrer Arbeit gefolgert, dass die Inhibierung dieser beiden Proteine eine neue Möglichkeit in der antithrombotischen Therapie darstellen könnte. Allerdings haben die Autoren die Rolle dieser Interaktion hinsichtlich einer pathogenen Thrombusbildung im Rahmen der Atherosklerose nicht berücksichtigt. Mallat et al. (1999) haben gezeigt, dass vor allem Mikropartikel aus apoptotischen Leukozyten für thrombotische Komplikationen nach Plaqueruptur verantwortlich sind.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass apoptotische Mikropartikel im Vergleich zu nicht-apoptotischen Mikropartikeln eine erhöhte Expression von PSGL-1 aufweisen. Diese erhöhte Expression von PSGL-1 würde eine verbesserte Interaktion der Mikropartikel mit Thrombozytenmembranen ermöglichen. Die daraus folgende direkte Lokalisation von TF auf Thrombozytenmembranen könnte die sehr schnelle Thrombinbildung, induziert durch apoptotische Mikropartikel, erklären. Überraschenderweise kam es jedoch durch Induktion der Apoptose nicht zu einer Heraufregulation, sondern zu einer kompletten Herabregulation von PSGL-1. PSGL-1 konnte weder auf der Zelloberfläche noch in Zelllysaten detektiert werden. Auch auf Mikropartikeln

apoptotischer Zellen kam es zu einer signifikanten Herabregulation von PSGL-1. Durch Induktion der Apoptose wurde PSGL-1 vermutlich proteolytisch von der Zelloberfläche abgespalten. Diese proteolytische Abspaltung führte zu einem kompletten Funktionsverlust von PSGL-1.

Zu der Regulation von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen existierten bisher keine Untersuchungen. Der Einfluss der Zellaktivierung auf die Expression von PSGL-1 wurde durch Davenpeck et al. (2000) untersucht. Nach Aktivierung von Leukozyten (Neutrophile, Monozyten, Eosinophile) mit PMA (10 ng/ml) oder PAF (100 nM) für 10 Min. wurde die PSGL-1-Expression auf der Zelloberfläche um ca. 20-30% gesenkt. Dieser Befund konnte in der eigenen Arbeit reproduziert werden. Die Inkubation der Zellen mit PMA führte außerdem zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl PSGL-1-positiver Mikropartikel. In Western-Blot-Analysen der Mikropartikel PMA-stimulierter Zellen wurde vor allem eine ca. 40 kD große Bande detektiert, aber nur eine schwache Bande auf Höhe des nativen PSGL-1. Die Funktion dieses 40 kD großen Bruchstückes ist unbekannt.

Im Gegensatz zu der schnellen, jedoch relativ geringen (20-30% in 1 h) Herabregulation von PSGL-1 in PMA-aktivierten Zellen kam es durch Induktion der Apoptose mit Staurosporin zu einer langsamen, jedoch vollständigen (>90% in 12 h) Herabregulation von PSGL-1. Um den Effekt einer möglichen unspezifischen Aktivierung der Zellen durch Staurosporin auszuschließen, wurde die PSGL-1 Expression nach einer 1-stündigen Inkubation mit Staurosporin untersucht. Diese kurzzeitige Inkubation der Zellen mit Staurosporin hatte keinen Einfluss auf die PSGL-1-Expression. In weiteren Versuchen mit zwei anderen Apoptose-Induktoren (Aktinomycin D und Etoposid) kam es auch zu einer kompletten Herabregulation von PSGL-1. Außerdem bestand ein zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Grad der Apoptose (gemessen durch Caspase-3- und PARP-Spaltung sowie Annexin-V-Bindung) und der Expression von PSGL-1 auf der Zelloberfläche. Das bedeutet, dass PSGL-1 durch einen Apoptose-abhängigen Mechanismus von der Zelloberfläche herabreguliert wird. Um die Relevanz der an U937-Zellen beobachteten Ergebnisse bewerten zu können, wurde die Expression von PSGL-1 auf der Oberfläche von Monozyten, die aus frischem Vollblut isoliert wurden, analysiert. Eine 12-stündige Inkubation isolierter Monozyten mit Staurosporin führte ebenfalls zum vollständigen Abbau von PSGL-1. Die an U937-Zellen gewonnenen Erkenntnisse lassen daher sehr wahrscheinlich Rückschlüsse auf die *in vivo* vorliegende Regulation von PSGL-1 auf apoptotischen Monozyten zu.

Da diese Versuche gezeigt haben, dass PSGL-1 nach Induktion der Apoptose nicht mehr auf der Zelloberfläche zu detektieren ist, wurde in weiteren Versuchen mittels Western-Blot untersucht, ob die verminderte Expression auf der Zelloberfläche auf eine Internalisierung des Proteins zurückzuführen ist. Auch in diesen Versuchen wurde eine komplette Herabregulation der PSGL-1-Expression nach Induktion der Apoptose mit Staurosporin, Aktinomycin D oder Etoposid beobachtet. Die Reduktion des zellulären PSGL-1-Gehaltes wurde auch mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. PSGL-1 konnte nicht in intrazellulären Kompartimenten detektiert werden. Diese Versuche deuteten ebenfalls nicht auf

eine Internalisierung des Proteins hin. Anschließend wurde untersucht, ob PSGL-1 durch einen lysosomalen Verdau abgebaut wird (Carpenter & Cohen, 1976). Lysosomen sind intrazelluläre membranäre Kompartimente, die eine Vielzahl saurer Hydrolasen beinhalten und für den kontrollierten Verdau von Makromolekülen verantwortlich sind. Lysosomale Enzyme entfalten ihre optimale Aktivität bei pH-Werten um pH = 5,0 und können durch basische Amine wie Ammoniumchlorid oder Chloroquin inhibiert werden (Koh et al., 2005). Durch Vorinkubation der Zellen mit Ammoniumchlorid und anschließende Induktion der Apoptose kam es zu einer leichten Retention des PSGL-1-Abbaus, Chloroquin hatte unter diesen Bedingungen keinen Einfluss auf den Abbau von PSGL-1. Die Wirkung von Ammoniumchlorid war jedoch darauf zurückzuführen, dass die Substanz einen anti-apoptotischen Effekt auf die Zellen ausübte. Dies wurde durch die Hemmung der PARP-Spaltung nachgewiesen. Die antiapoptotische Wirkung von Ammoniumchlorid wurde bereits beschrieben (Ogawa et al., 2004). Das bedeutet, dass PSGL-1 nach Induktion der Apoptose vermutlich nicht durch eine Internalisierung und lysosomalen Abbau herabreguliert wird.

Auch die transkriptionelle Herabregulation von PSGL-1 scheint für das Verschwinden des Proteins von der Zelloberfläche eine untergeordnete Rolle zu spielen. Durch Induktion der Apoptose kam es zu einer signifikanten Reduktion der PSGL-1-mRNA. Jedoch konnte in Versuchen mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid eine lange Halbwertszeit (> 12 h) des Proteins gezeigt werden. Daher kann die komplette Herabregulation von PSGL-1 bei Apoptose wahrscheinlich nicht über einen transkriptionellen Mechanismus erklärt werden.

Da PSGL-1 vermutlich nicht durch einen lysosomalen Abbau oder durch einen transkriptionellen Mechanismus herabreguliert wird, wurde eine mögliche proteolytische Abspaltung des Proteins untersucht. Zunächst wurden dazu die Mikropartikel-haltigen Zellüberstände nicht-apoptotischer und apoptotischer Zellen untersucht. Um eine Unterscheidung zwischen Mikropartikel-gebundenen und löslichen PSGL-1-Fragmenten machen zu können, wurden zusätzlich zu den Zellüberständen die Ultrazentrifugationsüberstände und -pellets untersucht. In den Western-Blots der Zellüberstände apoptotischer Zellen konnten keine Spaltprodukte von PSGL-1 nachgewiesen werden. Zwar konnte in den apoptotischen Mikropartikeln immer noch PSGL-1 (Monomer und Dimer) gefunden werden, jedoch wurden diese Mikropartikel sehr wahrscheinlich vor Induktion der Apoptose sezerniert. Vor Induktion der Apoptose wurden die Zellen 12 h lang in serumfreiem Medium inkubiert. Dieses Medium wurde vor Induktion der Apoptose nicht gegen frisches Medium ausgetauscht, weil eine unspezifische Aktivierung der Zellen durch den Mediumwechsel vermieden werden sollte. Das in den apoptotischen Mikropartikeln nachgewiesene PSGL-1-Monomer und -Dimer stammte wahrscheinlich aus dieser 12-stündigen Vorinkubation der Zellen und den ersten Stunden der Staurosporin-Inkubation, die noch zu keiner Herabregulation von PSGL-1 führten. Dass jedoch in den Zellüberständen keine PSGL-1-Spaltprodukte nachgewiesen werden konnten, sprach zunächst nicht für eine proteolytische Abspaltung des Proteins von der Zelloberfläche. Mit einem zweiten Antikörper, der das zytosolische C-terminale Ende von PSGL-1 detektiert, wurden Western-Blot-Analysen der Zelllysate nicht-apoptotischer und

apoptotischer Zellen durchgeführt. Bei einer proteolytischen Abspaltung von PSGL-1 hätten kleinere Fragmente von PSGL-1 in den Zelllysaten detektierbar sein müssen. Es konnten jedoch auch mit diesem Antikörper keine Spaltprodukte von PSGL-1 detektiert werden. Diese Ergebnisse ließen zunächst unwahrscheinlich erscheinen, dass PSGL-1 durch eine proteolytische Abspaltung von der Zelloberfläche herabreguliert wird. Dennoch wurde in einer weiteren Versuchsreihe indirekt nachgewiesen, dass PSGL-1 vermutlich doch durch Proteolyse von der Zelloberfläche abgespalten wird. In dieser Versuchsreihe wurden die Zellen mit einem Phycoerythrin-gekoppelten Anti-PSGL-1-Antikörper fluoreszenzmarkiert. Nach einer 6-stündigen Inkubation der Zellen ohne und mit Zusatz von Staurosporin wurde die Fluoreszenz des Zellüberstandes gemessen. Durch die Apoptose kam es zu einem starken Anstieg der Fluoreszenz des Zellüberstandes. Das bedeutet, dass PSGL-1 vermutlich proteolytisch von der Zelloberfläche abgespalten wird. Interessanterweise kam es durch die Vorinkubation der Zellen mit dem Antikörper zu einer deutlich Reduktion der PSGL-1-Abspaltung. Das zeigt, dass der Antikörper möglicherweise in einer Region im PSGL-1-Molekül bindet, in der die proteolytische Spaltung des Proteins erfolgt. Dies könnte auch erklären, warum keine proteolytischen Fragmente im Zellüberstand apoptotischer Zellen gefunden werden konnten.

Damit wurde indirekt gezeigt, dass die Herabregulation von PSGL-1 vermutlich doch durch proteolytischen Abbau erfolgt. Dieses Phänomen ist als Protein-Ectodomänen-Abspaltung bekannt (Arribas & Borroto, 2002). Die Protein-Ectodomänen-Abspaltung erfolgt durch Endoproteasen auf der Zelloberfläche. Durch die Aktivität dieser Enzyme, auch Convertasen, Sheddasen oder Sekretasen genannt, kommt es zu einer Abspaltung eines großen Fragments eines Substratproteins, manchmal sogar der gesamten extrazellulären Domäne (Ectodomäne) (Blobel, 2000; Dello Sbarba & Rovida, 2002). Die Regulation durch Ectodomänen-Abspaltung erfolgt bei einer überraschend großen Anzahl von Proteinen, bei den meisten dieser Proteine unter dem Einfluss einer Metalloprotease (Dello Sbarba & Rovida, 2002; Schlondorff & Blobel, 1999).

In initialen Versuchen wurde daher der Einfluss von Inhibitoren verschiedener Protease-Klassen auf die Abspaltung von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen untersucht. Die Konzentrationen der jeweiligen Inhibitoren entsprachen nach Angaben des Herstellers üblichen in Zellkultur gebräuchlichen Werten (Sigma, München). Als Serinprotease-Inhibitoren wurden Aprotinin, Pefabloc SC und Leupeptin eingesetzt. Cysteinproteasen wurden durch Zugabe von E-64 und N-Ethylmaleimid gehemmt. Die Hemmung von Aspartatproteasen erfolgte durch Zugabe von Pepstatin A.

Mit Ausnahme von N-Ethylmaleimid führte keiner dieser Inhibitoren zu einer Hemmung der Staurosporin-induzierten Abspaltung von PSGL-1. Die Wirkung von N-Ethylmaleimid wird am Ende dieses Abschnitts diskutiert.

Metalloproteasen wurden durch EDTA, 1,10-Phenanthrolin, Galardin und Phosphoramidon inhibiert. EDTA, 1,10-Phenanthrolin und Galardin führten zu einer signifikanten Hemmung der Apoptose-induzierten PSGL-1-Abspaltung. Diese Versuche haben damit noch einmal bestätigt, dass PSGL-1 vermutlich

durch proteolytischen Abbau von der Zelloberfläche herabreguliert wird. Phosphoramidon hatte keine inhibitorische Wirkung in diesem System. Phosphoramidon ist ein starker Inhibitor von Metalloendoproteasen, Thermolysin und Elastasen, aber nur ein schwacher Inhibitor von Collagenasen (MMP-1, MMP-8 und MMP-13). EDTA und 1,10-Phenanthrolin hemmen Metalloproteasen durch eine unspezifische Bindung zweiseitiger Kationen. Galardin ist ein potenter, zellpermeabler Breitspektrum-MMP-Inhibitor, der als Zink-bindende Gruppe einen Hydroxamat-Rest enthält. Galardin inhibiert viele MMP bereits im nanomolaren Bereich (Calbiochem, San Diego, USA). MMP-Inhibitoren auf Hydroxamsäure-Basis sind kleine Moleküle und weisen nur eine begrenzte Selektivität auf. Durch gezielte Veränderungen der Seitenketten kann man eine Selektivität für die S1-Tasche bestimmter MMP erzeugen (Hanessian et al., 2001). Die Selektivität für bestimmte MMP ist jedoch stark konzentrationsabhängig, höhere Konzentrationen einzelner Substanzen hemmen unspezifisch eine Reihe weiterer MMP (Rao, 2005). Außerdem zeigten einige Arbeiten, dass Inhibitoren auf Hydroxamsäure-Basis neben MMP auch Proteasen der ADAM-Familie sehr wirksam inhibieren (Seals & Courtneidge, 2003). Die Freisetzung von PSGL-1 erfolgte daher vermutlich durch eine Metalloprotease aus der MMP- bzw. ADAM-Familie. Zur Identifizierung der verantwortlichen Metalloprotease wurde eine Vielzahl spezifischer MMP-Inhibitoren getestet. Die Konzentrationen der MMP-Inhibitoren wurden so gewählt, dass sie annähernd dem dreifachen IC_{50} -Wert entsprachen. Bei diesen Konzentrationen wurde die PSGL-1-Abspaltung durch keinen der Inhibitoren beeinflusst. Bei Zugabe dieser Inhibitoren in unspezifischen Konzentrationen ($> 10 \times IC_{50}$) wurde die Abspaltung von PSGL-1 durch alle Substanzen gehemmt.

Diese Ergebnisse bestätigten die Schlussfolgerungen aus den initialen Versuchen, dass die gesuchte Protease aus der MMP- bzw. ADAM-Familie stammen muss. Durch den Einsatz der speziellen Inhibitoren war eine Beteiligung der Proteasen MMP-1, -2, -3, -8, -9 und -13 an der Abspaltung von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen als unwahrscheinlich anzusehen.

MMP-7 spielt bei der Abspaltung von E-Cadherin (McGuire et al., 2003) sowie bei der Freisetzung von Syndecan-1 (Li et al., 2002) eine wichtige Rolle. Da aber der MMP-Inhibitor II, der unter anderem MMP-7 inhibiert, keine Wirkung in diesem System zeigte, galt eine Beteiligung dieser Metalloprotease an der Regulation von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen als unwahrscheinlich.

Weitere Hinweise auf die gesuchte Convertase ergaben sich aus einer Interpretation der durchflusszytometrischen Ergebnisse. Nach Induktion der Apoptose und beginnender PSGL-1-Abspaltung fielen zwei distinkte Populationen im Histogramm auf: eine PSGL-1-positive Population und eine PSGL-1-negative Population. Dieses Muster deutete darauf hin, dass PSGL-1 durch eine membranständige Protease moduliert wurde, denn bei einer sezernierbaren Protease würde PSGL-1 gleichzeitig auf allen Zellen moduliert werden. Die Folge wäre eine Linksverschiebung im Histogramm. Ein ähnlicher PSGL-1-Abbau, wie er unter apoptotischen Bedingungen stattfindet, ist von Lichtenthaler et al. (2003) beschrieben worden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass PSGL-1 durch die

membranständige Aspartylprotease BACE-1 abgebaut wird. BACE-1 spielte bei der Abspaltung von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen jedoch keine Rolle, weil eine Hemmung der Freisetzung weder durch den BACE-Inhibitor IV und noch durch BACE-1-Antikörper erreicht wurde. Zu den membranständigen Metalloproteasen gehören ebenfalls Proteasen der ADAM-Familie und der MT-MMP-Familie.

Die transmembranären Proteasen ADAM-10 und ADAM-17 sind bei der Ectodomänen-Freisetzung einer Reihe von Proteinen beteiligt (Ludwig et al., 2005). Lichtenthaler et al. (2003) zeigten eine Modulation von PSGL-1 durch ADAM-10. Weder ADAM-10 noch ADAM-17 waren an der Staurosporin-induzierten Freisetzung von PSGL-1 beteiligt: ADAM-10 wird sowohl durch TIMP-1 als auch TIMP-3 inhibiert (Amour et al., 2000), ADAM-17 durch TIMP-3 (Amour et al., 1998). Weder TIMP-1 noch TIMP-3 hatten eine inhibitorische Wirkung auf die Modulation von PSGL-1, Antikörper gegen diese beiden Proteasen hatten ebenfalls keinen Einfluss. Die fehlende Wirkung von TIMP-1 und TIMP-3 deutete auch darauf hin, dass Metalloproteasen der MT-MMP-Familie nicht an der PSGL-1-Abspaltung unter apoptotischen Bedingungen beteiligt waren (Zhao et al., 2004).

Die enzymatische Aktivität der Proteasen ADAM-8 und ADAM-9 wird durch TIMP-Proteine nicht reguliert (Amour et al., 2002). Izumi et al. (1998) haben gezeigt, dass ADAM-9 an der HB-EGF-Ectodomänen-Abspaltung beteiligt ist. ADAM-9 ist in der aktiven Form auf der Zelloberfläche lokalisiert (Seals & Courtneidge, 2003) und würde damit der gesuchten membranständigen Protease entsprechen. In Western-Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass die inaktive Form von ADAM-9 in den Zelllysaten apoptotischer Zellen stark reduziert war. Allerdings wurde sowohl in apoptotischen als auch in nicht-apoptotischen Zellen eine starke Bande auf Höhe der aktivierten ADAM-9 detektiert. Nach Angaben des Herstellers kommt es bei der Zellyse zu einer raschen Aktivierung der latenten Form, womit die Detektion der aktiven Form auch bei den Kontrollzellen erklärt werden könnte. ADAM-9 wird durch den Metalloprotease-Inhibitor TAPI-0 inhibiert ($IC_{50} = 17 \text{ nM}$). Die Inkubation der Zellen mit TAPI-0 (100 nM) führte zu einer signifikanten Hemmung der Apoptose-induzierten Abspaltung von PSGL-1. Diese Befunde wiesen darauf hin, dass ADAM-9 an der Abspaltung von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen beteiligt sein könnte.

Auch ADAM-8 könnte für die Freisetzung von PSGL-1 verantwortlich sein: Naus et al. (2004) haben gezeigt, dass ADAM-8 an der Ectodomänen-Freisetzung des Zelladhäsionsmoleküls CHL1 („close homologue of L1“) beteiligt ist. Allerdings ist unklar, ob die Metalloprotease-Domäne von ADAM-8 membranständig ist oder infolge einer Autoaktivierung sezerniert wird (Schlomann et al., 2002). Die bisherigen Versuche haben gezeigt, dass zumindest sehr wahrscheinlich eine Metalloprotease an der Abspaltung von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen beteiligt ist. Die Limitation der Identifizierung der verantwortlichen Protease bestand darin, dass spezifische Inhibitoren für eine Vielzahl von Proteasen nicht verfügbar sind.

Um weitere Hinweise auf die gesuchte Protease zu bekommen, wurde eine Analyse der PSGL-1-Peptidsequenz mittels der Datenbank „Peptide Cutter“ (<http://www.expasy.org/tools/peptidecutter/>) auf potentielle Prozessierung durch verschiedene Proteasen durchgeführt. Die Analyse der Peptidsequenz lieferte jedoch auch keinen Hinweis auf die gesuchte Protease. Zum einen ist nur eine limitierte Anzahl von Proteasen in dieser Datenbank aufgelistet, zum anderen waren die Proteasen, die PSGL-1 schneiden könnten, nicht an der PSGL-1-Abspaltung unter apoptotischen Bedingungen beteiligt.

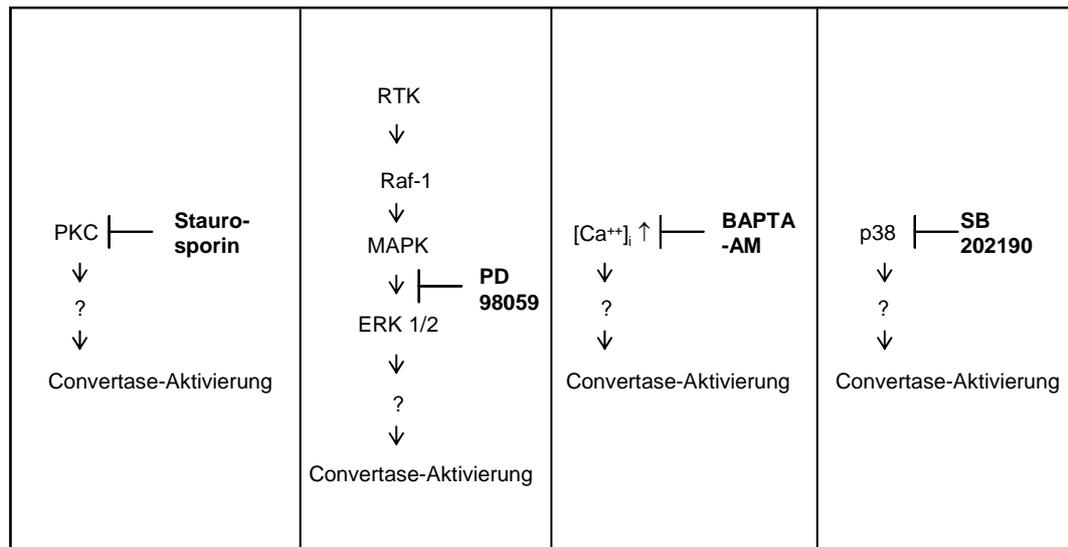
Die Cysteinprotease Caspase-1 wird in humanen Monozyten unter anderem auf der Zelloberfläche exprimiert und ist dort an der Maturation des Interleukin-1 β beteiligt (Singer et al., 1995). Jedoch scheint sie nicht an der PSGL-1-Abspaltung beteiligt zu sein, da weder die Inkubation der Zellen mit einem spezifischen Caspase-1-Inhibitor noch mit einem Anti-Caspase-1-Antikörper zu einer Verminderung der PSGL-1-Abspaltung führten. Die anderen potentiellen Ergebnisse der „Peptide Cutter“-Analyse mussten insofern nicht weiter untersucht werden, als es sich bei den Proteasen entweder um bakterielle Enzyme oder um Proteasen aus der Familie der Serin- und Aspartylproteasen handelte. Mit den Inhibitoren entsprechender Gruppen konnte keine Hemmung der PSGL-1-Abspaltung erzielt werden.

Somit bleibt abschließend die Wirkung von N-Ethylmaleimid zu erwähnen. N-Ethylmaleimid scheint die PSGL-1-Freisetzung in zwei verschiedenen Systemen zu beeinflussen: einerseits führte die Zugabe von N-Ethylmaleimid zu einer Abspaltung von PSGL-1 und einer Verminderung der PSGL-1-Fluoreszenz. Andererseits wurde die PSGL-1-Abspaltung durch die Apoptose-aktivierte Protease von der Zelloberfläche vollständig durch N-Ethylmaleimid gehemmt. Die Abnahme der PSGL-1-Fluoreszenz kann durch das „cysteine switch“-Modell der Aktivierung von Metalloproteasen (Amit et al., 2001) erklärt werden. Im inaktiven Zustand koordiniert ein konservierter freier Cysteinrest mit dem Zinkion der katalytischen Domäne der Metalloprotease. Durch Alkylierung wird die koordinative Bindung dieses Cysteinrests mit dem Zinkion aufgehoben und die Protease aktiviert. Gleichzeitig scheint diese Alkylierung die Abspaltung von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen zu inhibieren. Diese Beobachtung lässt zwei Rückschlüsse zu: a) N-Ethylmaleimid inhibiert die Protease durch Alkylierung. b) N-Ethylmaleimid alkyliert das Substrat (PSGL-1) und verhindert die Abspaltung. Im extrazellulären Teil von PSGL-1 existiert jedoch nur ein Cystein-Rest, über den das Protein dimerisiert (McEver & Cummings, 1997). Eine Alkylierung des Substrates unter nicht-reduzierenden Bedingungen ist zumindest nicht sehr wahrscheinlich. Daher wird vermutlich die Protease alkyliert. ADAM-Proteasen sind Cystein-reiche Proteine (MCD; metalloproteinase, disintegrin, cysteine rich) (Dello Sbarba & Rovida, 2002). Für einige ADAM-Proteasen ist eine Aktivierung durch N-Ethylmaleimid beschrieben worden. Eine Inhibierung von ADAM-Proteasen durch N-Ethylmaleimid werden ist denkbar, aber bislang noch nicht beschrieben worden.

Somit kann aus den Versuchen mit den Inhibitoren verschiedener Protease-Klassen das Fazit gezogen werden, dass PSGL-1 unter apoptotischen

Bedingungen vermutlich durch eine Metalloprotease abgespalten wird, die durch N-Ethylmaleimid hemmbar ist. Mögliche Kandidaten könnten ADAM-8 und ADAM-9 darstellen.

Dello Sbarba & Rovida (2002) beschreiben verschiedene bekannte Signaltransduktionswege, die zu einer Aktivierung der Protein-Ectodomänen-Abspaltung führen können (Abb. 42).



adaptiert aus Dello Sbarba & Rovida (2002)

Abb. 42:

Signaltransduktionswege, die zu einer Aktivierung der Protein-Ectodomänen-Abspaltung führen können. RTK = Rezeptor-Tyrosin-Kinase, PKS = Protein-Kinase C, MAPK = Mitogen-aktivierte Proteinkinase, ERK = extrazellulär-regulierte Kinase.

Die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) war der erste beschriebene Mechanismus, der zu einer Abspaltung von Protein-Ecotodomänen führen kann. Dieser Weg kann über eine Aktivierung der Phospholipase C zur Abspaltung verschiedener Proteine von der Zelloberfläche führen (z.B. Interleukin-2 (IL-2) und IL-4) (Rovida et al., 2001). Die PKC kann durch Staurosporin inhibiert werden. In der eigenen Arbeit führte die Inkubation der Zellen mit Staurosporin zu einer vollständigen Herabregulation von PSGL-1. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die PKC an der Herabregulation von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen beteiligt ist.

Neben der Aktivierung der PKC existieren einige PKC-unabhängige Mechanismen, die zu einer Aktivierung von Convertasen und einer nachfolgenden Abspaltung von Protein-Ectodomänen führen können. Einer dieser Mechanismen ist der Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAPK)-Weg, der meist durch Aktivierung von Tyrosinkinase-Rezeptoren ausgelöst wird. Dieser Weg kann durch den Inhibitor PD98059 gehemmt werden. Die Inkubation der Zellen mit PD98059

fürte jedoch zu keiner Hemmung der PSGL-1-Abspaltung unter apoptotischen Bedingungen.

Ein Anstieg der intrazellären Ca^{++} -Konzentration sowie eine Aktivierung des p38-Weges stellen weitere Mechanismen zur Aktivierung von Convertasen dar. Die Inhibition dieser Mechanismen mit BAPTA-AM und SB202190 (Abb. 42) führte ebenfalls zu keiner Hemmung der Apoptose-induzierten Abspaltung von PSGL-1.

Dies zeigt, dass es sich bei der Abspaltung von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen um einen bisher nicht beschriebenen Mechanismus handelt, dessen Aufklärung es weiterer Arbeiten bedarf. Möglicherweise handelt es sich bei der Abspaltung von PSGL-1 unter apoptotischen Bedingungen nicht um eine klassische Form der Ectodomänen-Abspaltung. Bei der klassischen Abspaltung wird ein großer Teil der extrazellulären Domäne abgespalten. Das Spaltprodukt lässt sich dann meist im Zellüberstand nachweisen und ist häufig noch funktionell aktiv. Bei der Aktivierung der U937-Zellen mit PMA konnte eine solche klassische Ectodomänen-Abspaltung beobachtet werden. Nach Inkubation der Zellen mit PMA konnte in den Mikropartikeln ein 40 kD großes Spaltprodukt von PSGL-1 detektiert werden. In den Überständen apoptotischer Zellen dagegen konnte weder in der löslichen Fraktion noch in den Mikropartikeln ein Spaltprodukt detektiert werden. Dennoch waren verschiedene Proteaseinhibitoren in der Lage, die Herabregulation von PSGL-1 zu verhindern. Diese Ergebnisse könnten dadurch erklärt werden, dass evtl. eine initiale Abspaltung durch eine membranständige Endoprotease erfolgt. Durch diese initiale Spaltung werden möglicherweise Schnittstellen für eine lösliche Exoprotease im Zellüberstand freigelegt. Die Exoprotease könnte einen schnellen, kompletten Abbau von PSGL-1 im Zellüberstand verursachen. Das residuale Stück des PSGL-1-Proteins in der Zellmembran könnte möglicherweise internalisiert und dann lysosomal abgebaut werden. Dies würde erklären, warum auch mit dem Anti-PSGL-1-Antikörper (H-300), der das C-terminale Ende von PSGL-1 erkennt, kein PSGL-1 in den Zelllysaten apoptotischer Zellen detektiert werden konnte.

Schließlich wurde untersucht, ob die Herabregulation von PSGL-1 zu einer Veränderung der Funktion des Proteins führt. Dazu wurde die Interaktion von U937-Zellen mit P-Selectin-exprimierenden Thrombozyten und Endothelzellen überprüft. Durch Induktion der Apoptose unterblieb die Aggregatbildung zwischen stimulierten Thrombozyten und apoptotischen U937-Zellen vollständig. Nach der Perfusion apoptotischer Zellen über Endothelzellen konnten keine adhärenen U937-Zellen detektiert werden. Das bedeutet, dass keine Interaktion zwischen P-Selectin und PSGL-1 stattfand. Die Apoptose führte zu einem vollständigen Funktionsverlust von PSGL-1.

Dieser Funktionsverlust von PSGL-1 kann als ein durchaus sinnvoller Mechanismus angesehen werden. Nach Induktion der Apoptose wird eine intrazelluläre Maschinerie (Capase-Kaskade) aktiviert, die zu einem geordneten Zusammenbruch des Zytoskeletts und einer Fragmentierung der DNA führt (Fischer & Schulze-Osthoff, 2005). Durch die Expression negativ geladener Phospholipide auf der Zelloberfläche werden apoptotische Zellen durch

Makrophagen erkannt und können phagozytiert werden (Matsura et al., 2002). Dieser organisierte Ablauf ermöglicht, dass der apoptotische Zelltod ohne eine Schädigung anderer Zellen bzw. eine entzündliche Reaktion erfolgt. Damit grenzt sich die Apoptose von der Nekrose ab, bei der die Zellen anschwellen, platzen und ihren gesamten Inhalt freisetzen (Proskuryakov et al., 2005). Dementsprechend werden bei der Nekrose auch benachbarte Zellen beschädigt. Eine solche Beschädigung benachbarter Zellen wäre auch möglich, wenn apoptotische Monozyten weiterhin PSGL-1 auf der Zelloberfläche exprimieren würden. Durch Expression von PSGL-1 auf der Zelloberfläche kann es über P-Selectin zu einer Adhäsion von Thrombozyten kommen. Thrombozyten exprimieren eine Vielzahl von Entzündungsmediatoren und Wachstumsstimuli (z.B. Platelet derived growth factor, PDGF; Transforming growth factor, TGF; Insulin-like growth factor, IGF; Epidermal growth factor, EGF; CD40-Ligand; ADP; Serotonin; Thromboxan) (Weber & Schrör, 1999). Wären also Thrombozyten auf der Oberfläche apoptotischer Monozyten lokalisiert, so käme es bei der Phagozytose zu einer Akkumulation der thrombozytären Entzündungsmediatoren in den Makrophagen. Als Folge dessen würden weitere Makrophagen rekrutiert werden, wie es bei Entzündungen der Fall ist. Außerdem gewährleistet der Funktionsverlust von PSGL-1, dass keine apoptotischen Monozyten an das Endothel binden können. Lokale Entzündungsreaktionen werden somit verhindert. Apoptotische Monozyten zirkulieren daher solange, bis sie schließlich in der Milz phagozytiert werden.

4.4 Funktionelle und therapeutische Konsequenzen

In dieser Arbeit konnte eine hohe Thrombogenität zellulärer Mikropartikel in einem physiologischen System (ETP-Messung) gezeigt werden. Die funktionellen Messungen der prokoagulatorischen Aktivität wurden in zwei verschiedenen Versuchsansätzen durchgeführt, und zwar wurde die prokoagulatorische Aktivität in Gegenwart und in Abwesenheit zusätzlicher negativ geladener Phospholipide (Thrombozytenmembranen) durchgeführt. Die Mikropartikel, die aus apoptotischen Zellen hervorgingen, induzierten auch in Abwesenheit negativ geladener Phospholipide eine starke Thrombinbildung. Die Mikropartikel aus nicht-apoptotischen Zellen führten nur in Gegenwart von Thrombozytenmembranen zu einer deutlichen Thrombinbildung. Das bedeutet, dass Mikropartikel apoptotischer Zellen *in vivo* vermutlich in der Lage sind, unabhängig von der Thrombozytenaktivierung zu einer starken Thrombinbildung zu führen, während die Thrombogenität nicht-apoptotischer Mikropartikel von einer Thrombozytenaktivierung abhängig ist. Aber auch in Gegenwart zusätzlicher negativ geladener Phospholipide führte apoptotische Mikropartikel zu einer stärkeren Thrombinbildung als nicht-apoptotische Mikropartikel. Obwohl mehrere in Frage kommende Mechanismen untersucht wurden, konnten die genauen Mechanismen, die zu der erhöhten prokoagulatorischen Aktivität der apoptotischen Mikropartikel führten, in dieser Arbeit nicht definitiv geklärt werden.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass SMC unter Flussbedingungen zu einer wichtigen Quelle für zirkulierenden TF werden können. Es ist bekannt, dass TF an zyklischen Flussvariationen, wie sie nach PTCA auftreten können (Sunamura et al., 1996), beteiligt ist. Es ist jedoch unbekannt, über welchen Mechanismus TF-positive Mikropartikel aus SMC in Thromben inkorporiert werden können. Bisherige Arbeiten gehen davon aus, dass leukozytäre Mikropartikel über eine Interaktion von P-Selectin und PSGL-1 in Thromben inkorporiert werden. Allerdings wurde in diesen Arbeiten nicht berücksichtigt, dass es unter apoptotischen Bedingungen zu einem völligen Funktionsverlust von PSGL-1 kommt. Dennoch scheinen apoptotische Mikropartikel besonders nach einer Plaqueruptur für thromboembolische Komplikationen zu sorgen (Soejima et al., 1999a; Mallat et al., 1999).

In der Arbeit von Falati et al. (2003) wurde gezeigt, dass bei P-Selectin^{-/-}-Mäusen überhaupt keine Akkumulation von TF in den Thrombus stattfindet. Bei PSGL-1^{-/-}-Mäusen ist die Inkorporation von TF in den Thrombus stark vermindert, aber es findet dennoch eine Akkumulation von TF statt. Kritisch in der Betrachtung der Autoren könnte der gewählte Beobachtungszeitraum sein, da der Einbau von TF in den Thrombus nur in den ersten 25-100 Sekunden nach Gefäßverletzung untersucht wurde. Vielleicht ist die Interaktion zwischen PSGL-1 und P-Selectin für einen schnellen Einbau von TF in Thromben verantwortlich, bei Abwesenheit von PSGL-1 können evtl. andere, langsamere Mechanismen eine Rolle spielen. Für die Existenz anderer Mechanismen gibt es zwei besonders wichtige Arbeiten: Day et al. (2004) und Brisset et al. (2003). In der Arbeit von Day und Kollegen fand nach Gefäßverletzung auch in Abwesenheit leukozytärer

Mikropartikel-Quellen ein ganz normales Thrombuswachstum statt. Das bedeutet, dass in dieser Arbeit zelluläre Mikropartikel entweder keine Rolle gespielt haben oder aber dass Mikropartikel aus anderen Quellen als Leukozyten und somit unabhängig von PSGL-1 das Thrombuswachstum propagierten. Die letztere Hypothese wird durch die Arbeit von Brisset und Kollegen unterstützt. In dieser Arbeit wurde Blut gesunder Probanden über Collagen-beschichtete Glasplättchen perfundiert und die Fibrin- und Thrombozytendeposition gemessen. Wurde das Blut mit Mikropartikeln aus apoptotischen SMC versetzt, so kam es zu einer 3-fach erhöhten Fibrin- und einer 2-fach erhöhten Thrombozytenablagerung. Dies bedeutet, dass es andere wichtige Mechanismen außer der Interaktion zwischen P-Selectin und PSGL-1 für die Akkumulation von TF in wachsende Thromben geben muss, die der weiteren Aufklärung bedürfen.

So lange die Mechanismen, über die zirkulierender TF in Thromben inkorporiert werden kann, nicht vollständig verstanden sind, scheint ein therapeutischer Ansatz mit einer direkten Inhibierung der TF/FVIIa-Aktivität bei Patienten, die eine erhöhte Konzentration TF-positiver Mikropartikel im Plasma haben (z.B. ACS, Sepsis, PTCA) die sinnvollste Maßnahme zu sein.

In klinischen Prüfungen sind drei Substanzen evaluiert worden, die die Aktivität des TF/FVIIa-Komplexes beeinflussen (Hirsh et al., 2005):

- rekombinanter TFPI
- Nematoden-antikoagulatorisches-Peptid (NAPc2)
- inaktivierter FVIIa (FVIIai)

Rekombinanter TFPI wurde zur Behandlung der Sepsis in klinischen Studien der Phase-2 und Phase-3 mit Placebo verglichen. Die vielversprechenden Ergebnisse der Phase-2 (Senkung der relativen Letalität um 20%) (Abraham et al., 2001) konnten in der nachfolgenden Phase-3-Studie (Abraham et al., 2003) nicht bestätigt werden.

NAPc2 ist ein Polypeptid, das ursprünglich aus dem Hakenwurm *Anclystoma caninum* isoliert worden ist und mittlerweile durch rekombinante Herstellung in Hefekulturen gewonnen wird (Hirsh et al., 2005). NAPc2 bindet an die nicht-katalytische Domäne von FX und FXa und inhibiert dann im Komplex TF/FVIIa/FXa/NAPc2 die katalytische Aktivität von FVIIa (Cappello et al., 1995). NAPc2 wurde in einer klinischen Studie der Phase-2 Patienten, die einer Kniearthroplastie unterzogen wurden, postoperativ appliziert (Lee et al., 2001). Die Sicherheit von NAPc2 wurde in einer randomisierten, doppelblinden, Placebo-kontrollierten klinischen Studie an 154 Patienten, bei denen eine Koronarangiographie durchgeführt wurde, evaluiert (Moons et al., 2003). Als Ergebnis zeigte die Studie, dass die Inhibition von TF mit NAPc2 in einer Dosierung von maximal 7,5 µg/kg in Kombination mit Acetylsalicylsäure, Clopidogrel und unfraktioniertem Heparin zu einer deutlichen Reduktion der Thrombinbildung führt. Die Anwendung von NAPc2 in dieser Dosierung erwies sich als sicher.

Der antikoagulatorische Effekt von FVIIa entsteht durch kompetitive Hemmung des FVIIa hinsichtlich der Bindung an TF. In einer Phase-2-Studie an 491 Patienten wurde FVIIa allein bzw. in Kombination mit Heparin gegen die alleinige Gabe von Heparin verglichen. Beide Gruppen waren der alleinigen Gabe von Heparin jedoch nicht überlegen (Hirsh et al., 2005).

Neben der antikoagulatorischen Wirkung ist die Inhibierung von TF bzw. TF/VIIa auch aus anderen Gesichtspunkten sinnvoll. Viele Enzyme der Gerinnungskaskade üben über die Aktivierung besonderer G-Protein-gekoppelter-Rezeptoren (GPCR) auch zelluläre Wirkungen aus. Das besondere an diesen GPCR ist, dass sie im extrazellulären Teil einen inaktiven, endogenen Liganden exprimieren. Durch Einwirkung bestimmter Proteasen wird ein Teil dieses Liganden abgeschnitten und führt damit zur Aktivierung des Rezeptors. Diese Rezeptoren werden daher als Protease-aktivierte-Rezeptoren (PAR) bezeichnet, von denen vier verschiedene Subtypen charakterisiert worden sind (PAR 1-4). PAR gelten heute als die wichtigsten Determinanten Koagulationsfaktor-abhängiger Signale und Funktionen auf vaskulären Zellen (Ruf et al., 2003). In atherosklerotisch veränderten Geweben (Nelken et al., 1992) und nach Gefäßverletzung (Wilcox et al., 1994) können PAR in SMC nachgewiesen werden. Eine Bedeutung von PAR für die Entstehung und Progression der Atherosklerose und Restenose nach PTCA konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden (Übersicht in Baykal et al., 1995).

Für den Komplex TF/VIIa konnte eine Aktivierung des PAR-2 gezeigt werden (Riewald & Ruf 2001). Die PAR-2-vermittelte Signaltransduktion dieses binären Komplexes scheint bei verschiedenen pathologischen Vorgängen (Entzündungsprozesse, Tumorangiogenese und –metastase, Atherosklerose) eine wichtige Rolle zu spielen (Übersicht in Rao & Pendurthi, 2005). Künftige Studien werden zeigen, ob die Inhibierung der PAR-vermittelten Wirkungen des TF/VIIa-Komplexes durch spezifische PAR-inhibierende Peptide (Covic et al., 2002; Stampfuss et al., 2003) oder aber direkte Inhibierung des Komplexes einen Benefit bei diesen Krankheiten bringen kann. Neben diesen spezifischen Inhibitoren ist für eine Reihe von Substanzen, die in der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen erfolgreich eingesetzt werden, ein Einfluss auf die prokoagulatorische Aktivität gezeigt worden. ACE-Inhibitoren (Soejima et al., 1999b) und AT-1-Blocker (Koh et al., 2004) reduzieren die prokoagulatorische Aktivität im Plasma hypertensiver Patienten. In ApoE^{-/-}-Mäusen verhinderte die Gabe des HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors Simvastatin die Expression von TF in atherosklerotischen Plaques (Bea et al., 2003). Die Hemmung der TF-Expression durch Statine scheint eine Gruppeneigenschaft darzustellen. All diese Substanzen werden mit einer lebensverlängernden Wirkung in Zusammenhang gebracht. Dies ist zwar nicht nur auf die Verringerung der TF-Expression im Plasma zurückzuführen, aber dieser Effekt könnte einen Teil zu der Wirkung dieser Substanzen beitragen.

Ein therapeutischer Ansatz mit einer alleinigen Inhibition von TF wird allerdings nicht als sinnvoll angesehen. In verschiedenen Studien hat sich eine TF-inhibierende Strategie zwar zunächst als vielversprechend erwiesen, aber besonders bezüglich der Anwendung von TFPI gab es keine Hinweise für einen therapeutischen Nutzen in einer Phase-3-Studie. Die Hemmung der Blutgerinnung

wird bei operativen Eingriffen und postoperativ weiterhin in erster Linie durch Heparin erfolgen. Allerdings könnte eine zusätzliche Therapie mit einer TF-inhibierenden Strategie in besonderen klinischen Situationen einen therapeutischen Nutzen darstellen. Dies könnte besonders in den Situationen der Fall sein, in denen es zu einer erhöhten Freisetzung von TF in die Zirkulation kommen kann. So führt die mechanische Schädigung des Endothels bei einer PTCA zu einer Freisetzung von SMC hin zur Blutbahn. Eine temporäre, periprozedurale TF-inhibierende Therapie in Kombination mit Heparin wäre in der Lage, neben einer allgemeinen Koagulationshemmung gezielt in einen für diese Situation typischen Aktivierungsvorgang (zirkulierender TF) einzugreifen.

5 Zusammenfassung

Tissue Factor (TF) ist der wichtigste Initiator der Blutgerinnung *in vivo*. TF ist ein transmembranäres Glykoprotein, das in der Gefäßwand exprimiert wird, um dort nach einer Gefäßverletzung die Blutgerinnung zu initiieren und den Organismus so vor Blutverlusten zu schützen. Lange Zeit galt das Paradigma, dass TF ausschließlich in Zellen lokalisiert ist, die nicht in direktem Kontakt mit der Blutbahn stehen. Allerdings ist seit einigen Jahren bekannt, dass TF auch im Plasma gesunder Probanden zirkuliert. Dieser zirkulierende TF ist meist an zelluläre Mikropartikel gebunden. Die wichtigsten zellulären Quellen für TF-haltige Mikropartikel sind Monozyten und glatte Gefäßmuskelzellen. Verschiedene Arbeiten haben in den letzten Jahren gezeigt, dass zirkulierender TF funktionell aktiv ist und eine bedeutende Rolle für das Wachstum von Thromben nach Gefäßverletzung hat. Eine erhöhte Konzentration des zirkulierenden TF wurde bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom sowie bei Patienten, bei denen eine Ballondilatation durchgeführt wurde, gemessen. Die erhöhte Konzentration des zirkulierenden TF wird mit thromboembolischen Komplikationen bei diesen Patienten in Verbindung gebracht.

In dieser Arbeit wurde die prokoagulatorische Aktivität von Mikropartikeln aus der humanen monozytären Zelllinie U937 und aus humanen glatten Gefäßmuskelzellen der Arteria mammaria (SMC) untersucht, da bekannt ist, dass Monozyten und SMC die wichtigsten zellulären Quellen für zirkulierenden TF sind.

Insbesondere wurden die Mechanismen untersucht, durch die SMC zu einer bedeutenden pathophysiologischen Quelle für zirkulierenden TF werden können. Unter statischen Bedingungen sezernieren SMC langsam (Stunden bis Tage) TF-haltige Mikropartikel in den Zellüberstand. Unter der Einwirkung von Fluss kommt es jedoch zu einer schnellen (Minuten) Freisetzung von funktionell aktivem TF aus diesen Zellen. Die Freisetzung TF-haltiger Mikropartikel unter Flussbedingungen ist transient. Bereits nach einer 10-minütigen Perfusion werden nur noch basale Mengen von TF in das Perfusat freigesetzt. Allerdings kommt es nach einer 60-minütigen flussfreien Phase wieder zu einer signifikanten Reexposition von funktionell aktivem TF. Das bedeutet, dass SMC unter Flussbedingungen, beispielsweise nach einer Endothelverletzung durch Ballondilatation und damit einhergehender Exposition von SMC hin zur Blutbahn, zu einer bedeutenden Quelle für TF-haltige Mikropartikel werden können.

Eine weitere Quelle für zirkulierende TF-haltige Mikropartikel stellen atherosklerotische Plaques dar. Aus Extrakten atherosklerotischer Plaques, die aus einer Vielzahl von Mikropartikeln bestehen, die aus apoptotischen Zellen abgeschnürt wurden, werden Mikropartikel mit einer sehr großen prokoagulatorischen Aktivität freigesetzt. Deshalb wurde systematisch untersucht, inwiefern die Apoptose die Thrombogenität apoptotischer Mikropartikel im Vergleich zu nicht-apoptotischen Mikropartikeln beeinflusst und welche Mechanismen dafür verantwortlich sind.

Die Apoptose führte zu einer deutlichen Erhöhung der prokoagulatorischen Aktivität der aus SMC und U937-Zellen freigesetzten Mikropartikel. Die erhöhte

prokoagulatorische Aktivität der Mikropartikel aus apoptotischen SMC kann mit einer erhöhten Expression von TF pro Mikropartikel erklärt werden. Die Mechanismen, die zu der erhöhten prokoagulatorischen Aktivität der Mikropartikel aus apoptotischen U937-Zellen führten, konnten nicht definitiv geklärt werden. Bekannte Mechanismen, die zu einer Beeinflussung der TF-Aktivität führen (Expression negativ geladener Phospholipide; Expression von Tissue factor pathway inhibitor, TFPI, und Glucose regulated proein, GRP78), scheinen keinen Einfluss auf die erhöhte prokoagulatorische Aktivität der Mikropartikel aus apoptotischen U937-Zellen zu haben. Ein weiteres Protein, das zu einer Beeinflussung der TF-Aktivität führen könnte, ist P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 (PSGL-1), da TF-haltige Mikropartikel über eine Interaktion zwischen thrombozytärem P-Selectin und PSGL-1 in wachsende Thromben eingebaut werden können. Daher wurde untersucht, ob die Apoptose zu einer Heraufregulation von PSGL-1 auf den Mikropartikeln apoptotischer U937-Zellen führte. Die Apoptose führte nicht zu einer Heraufregulation, sondern zu einer vollständigen Herabregulation von PSGL-1 und zu einem völligen Funktionsverlust des Proteins.

Die hohe prokoagulatorische Aktivität der Mikropartikel aus nicht-apoptotischen und apoptotischen Zellen war immer auf TF zurückzuführen und bietet die Möglichkeit für eine therapeutische Intervention. Die Hemmung der Blutgerinnung wird bei operativen Eingriffen und postoperativ zwar weiterhin in erster Linie durch Heparin erfolgen. Allerdings könnte eine zusätzliche Therapie mit einer TF-inhibierenden Strategie in besonderen klinischen Situationen einen therapeutischen Nutzen darstellen. Dies könnte besonders in den Situationen der Fall sein, in denen es zu einer erhöhten Freisetzung von TF in die Zirkulation kommen kann. So führt die mechanische Schädigung des Endothels bei einer PTCA zu einer Freilegung von SMC hin zur Blutbahn. Eine temporäre, periprozedurale TF-inhibierende Therapie in Kombination mit Heparin wäre in der Lage, neben einer allgemeinen Koagulationshemmung gezielt in einen für diese Situation typischen Aktivierungsvorgang (zirkulierender TF) einzugreifen.

6 Literaturverzeichnis

1. Abraham E, Reinhart K, Opal S, Demeyer I, Doig C, Rodriguez AL, Beale R, Svoboda P, Laterre PF, Simon S, Light B, Spapen H, Stone J, Seibert A, Peckelsen C, De Deyne C, Postier R, Pettila V, Artigas A, Percell SR, Shu V, Zwingelstein C, Tobias J, Poole L, Stolzenbach JC, Creasey AA. Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003; 290:238-247.
2. Abraham E, Reinhart K, Svoboda P, Seibert A, Olthoff D, Dal Nogare A, Postier R, Hempelmann G, Butler T, Martin E, Zwingelstein C, Percell S, Shu V, Leighton A, Creasey AA. Assessment of the safety of recombinant tissue factor pathway inhibitor in patients with severe sepsis: a multicenter, randomized, placebo-controlled, single-blind, dose escalation study. *Crit Care Med* 2001; 29:2081-2089.
3. Amit T, Amit T, Hochberg Z, Yogev-Falach M, Youdim MB, Youdim MB, Barkey RJ. Shedding of growth hormone-binding protein is inhibited by hydroxamic acid-based protease inhibitors: proposed mechanism of activation of growth hormone-binding protein secretase. *J Endocrinol* 2001; 169:397-407.
4. Amour A, Knight CG, English WR, Webster A, Slocombe PM, Knauper V, Docherty AJ, Becherer JD, Blobel CP, Murphy G. The enzymatic activity of ADAM8 and ADAM9 is not regulated by TIMPs. *FEBS Lett* 2002; 524:154-158.
5. Amour A, Knight CG, Webster A, Slocombe PM, Stephens PE, Knauper V, Docherty AJ, Murphy G. The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS Lett* 2000; 473:275-279.
6. Amour A, Slocombe PM, Webster A, Butler M, Knight CG, Smith BJ, Stephens PE, Shelley C, Hutton M, Knauper V, Docherty AJ, Murphy G. TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett* 1998; 435:39-44.
7. Annex BH, Denning SM, Channon KM, Sketch MH, Jr., Stack RS, Morrissey JH, Peters KG. Differential expression of tissue factor protein in directional atherectomy specimens from patients with stable and unstable coronary syndromes. *Circulation* 1995; 91:619-622.
8. Arribas J, Borroto A. Protein ectodomain shedding. *Chem Rev* 2002; 102:4627-4638.
9. Bach RR, Moldow CF. Mechanism of tissue factor activation on HL-60 cells. *Blood* 1997; 89:3270-3276.
10. Bajaj MS, Birktoft JJ, Steer SA, Bajaj SP. Structure and biology of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 2001; 86:959-972.
11. Barber AJ, Jamieson GA. Isolation and characterization of plasma membranes from human blood platelets. *J Biol Chem* 1970; 245:6357-6365.

12. Baykal D, Schmedtje JF, Jr., Runge MS. Role of the thrombin receptor in restenosis and atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1995; 75:82B-87B.
13. Bea F, Blessing E, Shelley MI, Shultz JM, Rosenfeld ME. Simvastatin inhibits expression of tissue factor in advanced atherosclerotic lesions of apolipoprotein E deficient mice independently of lipid lowering: potential role of simvastatin-mediated inhibition of Egr-1 expression and activation. *Atherosclerosis* 2003; 167:187-194.
14. Bhattacharjee G, Ahamed J, Pedersen B, El Sheikh A, Mackman N, Ruf W, Liu C, Edgington TS. Regulation of tissue factor--mediated initiation of the coagulation cascade by cell surface grp78. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:1737-1743.
15. Biro E, Sturk-Maquelin KN, Vogel GM, Meuleman DG, Smit MJ, Hack CE, Sturk A, Nieuwland R. Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. *J Thromb Haemost* 2003; 1:2561-2568.
16. Blobel CP. Remarkable roles of proteolysis on and beyond the cell surface. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12:606-612.
17. Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M, Nemerson Y. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med* 2003; 9:458-462.
18. Brisset AC, Terrisse AD, Dupouy D, Tellier L, Pech S, Navarro C, Sie P. Shedding of active tissue factor by aortic smooth muscle cells (SMCs) undergoing apoptosis. *Thromb Haemost* 2003; 90:511-518.
19. Butenas S, Mann KG. Blood coagulation. *Biochemistry (Mosc)* 2002; 67:3-12.
20. Butenas S, Mann KG. Active tissue factor in blood? *Nat Med* 2004; 10:1155-1156.
21. Cappello M, Vlasuk GP, Bergum PW, Huang S, Hotez PJ. Ancylostoma caninum anticoagulant peptide: a hookworm-derived inhibitor of human coagulation factor Xa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:6152-6156.
22. Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Van V, I, Demunck H, Kasper M, Breier G, Evrard P, Muller M, Risau W, Edgington T, Collen D. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* 1996; 383:73-75.
23. Carpenter G, Cohen S. 125I-labeled human epidermal growth factor. Binding, internalization, and degradation in human fibroblasts. *J Cell Biol* 1976; 71:159-171.
24. Contrino J, Hair G, Kreutzer DL, Rickles FR. In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease. *Nat Med* 1996; 2:209-215.

25. Covic L, Misra M, Badar J, Singh C, Kuliopulos A. Pepducin-based intervention of thrombin-receptor signaling and systemic platelet activation. *Nat Med* 2002; 8:1161-1165.
26. Cummings RD. Structure and function of the selectin ligand PSGL-1. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32:519-528.
27. Davenpeck KL, Brummet ME, Hudson SA, Mayer RJ, Bochner BS. Activation of human leukocytes reduces surface P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1, CD162) and adhesion to P-selectin in vitro. *Journal of Immunology* 2000; 165:2764-2772.
28. del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, Lopez JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* 2005; 106:1604-1611.
29. Dello Sbarba P, Rovida E. Transmodulation of cell surface regulatory molecules via ectodomain shedding. *Biol Chem* 2002; 383:69-83.
30. Delpino A, Castelli M. The 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78/BIP) is expressed on the cell membrane, is released into cell culture medium and is also present in human peripheral circulation. *Biosci Rep* 2002; 22:407-420.
31. Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest* 2004; 34:392-401.
32. Dieckmann-Schuppert A, Schnittler HJ. A simple assay for quantification of protein in tissue sections, cell cultures, and cell homogenates, and of protein immobilized on solid surfaces. *Cell Tissue Res* 1997; 288:119-126.
33. Dietzen DJ, Jack GG, Page KL, Tetzloff TA, Hall CL, Mast AE. Localization of tissue factor pathway inhibitor to lipid rafts is not required for inhibition of factor VIIa/tissue factor activity. *Thromb Haemost* 2003; 89:65-73.
34. Dietzen DJ, Page KL, Tetzloff TA. Lipid rafts are necessary for tonic inhibition of cellular tissue factor procoagulant activity. *Blood* 2004; 103:3038-3044.
35. Donate F, Kelly CR, Ruf W, Edgington TS. Dimerization of tissue factor supports solution-phase autoactivation of factor VII without influencing proteolytic activation of factor X. *Biochemistry* 2000; 39:11467-11476.
36. Eilertsen KE, Osterud B. Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004; 15:521-538.
37. Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skoloff G, Chou J, Vandendries E, Celi A, Croce K, Furie BC, Furie B. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med* 2003; 197:1585-1598.
38. Fink L, Holschermann H, Kwapiszewska G, Muyal JP, Lengemann B, Bohle RM, Santoso S. Characterization of platelet-specific mRNA by real-time PCR after laser-assisted microdissection. *Thromb Haemost* 2003; 90:749-756.

39. Fischer U, Schulze-Osthoff K. New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacol Rev* 2005; 57:187-215.
40. Folts J. An in vivo model of experimental arterial stenosis, intimal damage, and periodic thrombosis. *Circulation* 1991; 83:IV3-14.
41. Freyssinet JM. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost* 2003; 1:1655-1662.
42. Giesen PL, Fyfe BS, Fallon JT, Roque M, Mendlowitz M, Rossikhina M, Guha A, Badimon JJ, Nemerson Y, Taubman MB. Intimal tissue factor activity is released from the arterial wall after injury. *Thromb Haemost* 2000; 83:622-628.
43. Giesen PL, Nemerson Y. Tissue factor on the loose. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26:379-384.
44. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roque M, Fallon JT, Badimon JJ, Himber J, Riederer MA, Nemerson Y. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:2311-2315.
45. Hamik A, Setiadi H, Bu G, McEver RP, Morrissey JH. Down-regulation of monocyte tissue factor mediated by tissue factor pathway inhibitor and the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 1999; 274:4962-4969.
46. Hanessian S, MacKay DB, Moitessier N. Design and synthesis of matrix metalloproteinase inhibitors guided by molecular modeling. Picking the S(1) pocket using conformationally constrained inhibitors. *J Med Chem* 2001; 44:3074-3082.
47. Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, Regnault V, de Smed E, Wagenvoord R, Lecompte T, Beguin S. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; 32:249-253.
48. Himber J, Wohlgensinger C, Roux S, Damico LA, Fallon JT, Kirchhofer D, Nemerson Y, Riederer MA. Inhibition of tissue factor limits the growth of venous thrombus in the rabbit. *J Thromb Haemost* 2003; 1:889-895.
49. Hirsh J, O'Donnell M, Weitz JI. New anticoagulants. *Blood* 2005; 105:453-463.
50. Hockin MF, Jones KC, Everse SJ, Mann KG. A model for the stoichiometric regulation of blood coagulation. *J Biol Chem* 2002; 277:18322-18333.
51. Izumi Y, Hirata M, Hasuwa H, Iwamoto R, Umata T, Miyado K, Tamai Y, Kurisaki T, Sehara-Fujisawa A, Ohno S, Mekada E. A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J* 1998; 17:7260-7272.
52. Koh KK, Chung WJ, Ahn JY, Han SH, Kang WC, Seo YH, Ahn TH, Choi IS, Shin EK. Angiotensin II type 1 receptor blockers reduce tissue factor activity and plasminogen activator inhibitor type-1 antigen in hypertensive patients: a

randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Atherosclerosis* 2004; 177:155-160.

53. Koh YH, von Arnim CA, Hyman BT, Tanzi RE, Tesco G. BACE is degraded via the lysosomal pathway. *J Biol Chem* 2005; 280:32499-32504.
54. Kunzelmann-Marche C, Satta N, Toti F, Zhang Y, Nawroth PP, Morrissey JH, Freyssinet JM. The influence exerted by a restricted phospholipid microenvironment on the expression of tissue factor activity at the cell plasma membrane surface. *Thromb Haemost* 2000; 83:282-289.
55. Lee A, Agnelli G, Buller H, Ginsberg J, Heit J, Rote W, Vlasuk G, Costantini L, Julian J, Comp P, van der MJ, Piovella F, Raskob G, Gent M. Dose-response study of recombinant factor VIIa/tissue factor inhibitor recombinant nematode anticoagulant protein c2 in prevention of postoperative venous thromboembolism in patients undergoing total knee replacement. *Circulation* 2001; 104:74-78.
56. Lee AS. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci* 2001; 26:504-510.
57. Li Q, Park PW, Wilson CL, Parks WC. Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury. *Cell* 2002; 111:635-646.
58. Lichtenthaler SF, Dominguez DI, Westmeyer GG, Reiss K, Haass C, Saftig P, De Strooper B, Seed B. The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1. *J Biol Chem* 2003; 278:48713-48719.
59. Ludwig A, Hundhausen C, Lambert MH, Broadway N, Andrews RC, Bickett DM, Leesnitzer MA, Becherer JD. Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. *Comb Chem High Throughput Screen* 2005; 8:161-171.
60. Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:1015-1022.
61. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 1999; 99:348-353.
62. Mandal SK, Iakhiaev A, Pendurthi UR, Rao LV. Acute cholesterol depletion impairs functional expression of tissue factor in fibroblasts: modulation of tissue factor activity by membrane cholesterol. *Blood* 2005; 105:153-160.
63. Mann KG, Butenas S, Brummel K. The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:17-25.
64. Mannello F, Luchetti F, Falcieri E, Papa S. Multiple roles of matrix metalloproteinases during apoptosis. *Apoptosis* 2005; 10:19-24.

65. Marmur JD, Rossikhina M, Guha A, Fyfe B, Friedrich V, Mendlowitz M, Nemerson Y, Taubman MB. Tissue factor is rapidly induced in arterial smooth muscle after balloon injury. *J Clin Invest* 1993; 91:2253-2259.
66. Matsura T, Serinkan BF, Jiang J, Kagan VE. Phosphatidylserine peroxidation/externalization during staurosporine-induced apoptosis in HL-60 cells. *FEBS Lett* 2002; 524:25-30.
67. McEver RP, Cummings RD. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest* 1997; 100:S97-103.
68. McGee MP, Foster S, Wang X. Simultaneous expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor by human monocytes. A potential mechanism for localized control of blood coagulation. *J Exp Med* 1994; 179:1847-1854.
69. McGuire JK, Li Q, Parks WC. Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) mediates E-cadherin ectodomain shedding in injured lung epithelium. *Am J Pathol* 2003; 162:1831-1843.
70. Misumi K, Ogawa H, Yasue H, Soejima H, Suefuji H, Nishiyama K, Takazoe K, Kugiyama K, Tsuji I, Kumeda K, Nakamura S. Comparison of plasma tissue factor levels in unstable and stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 1998; 81:22-26.
71. Moons AH, Peters RJ, Bijsterveld NR, Piek JJ, Prins MH, Vlasuk GP, Rote WE, Buller HR. Recombinant nematode anticoagulant protein c2, an inhibitor of the tissue factor/factor VIIa complex, in patients undergoing elective coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:2147-2153.
72. Moreno PR, Bernardi VH, Lopez-Cuellar J, Murcia AM, Palacios IF, Gold HK, Mehran R, Sharma SK, Nemerson Y, Fuster V, Fallon JT. Macrophages, smooth muscle cells, and tissue factor in unstable angina. Implications for cell-mediated thrombogenicity in acute coronary syndromes. *Circulation* 1996; 94:3090-3097.
73. Mulder AB, Smit JW, Bom VJ, Blom NR, Ruiters MH, Halie MR, van der MJ. Association of smooth muscle cell tissue factor with caveolae. *Blood* 1996; 88:1306-1313.
74. Nakagawa K, Zhang Y, Tsuji H, Yoshizumi M, Kasahara T, Nishimura H, Nawroth PP, Nakagawa M. The angiogenic effect of tissue factor on tumors and wounds. *Semin Thromb Hemost* 1998; 24:207-210.
75. Naus S, Richter M, Wildeboer D, Moss M, Schachner M, Bartsch JW. Ectodomain shedding of the neural recognition molecule CHL1 by the metalloprotease-disintegrin ADAM8 promotes neurite outgrowth and suppresses neuronal cell death. *J Biol Chem* 2004; 279:16083-16090.
76. Nelken NA, Soifer SJ, O'Keefe J, Vu TK, Charo IF, Coughlin SR. Thrombin receptor expression in normal and atherosclerotic human arteries. *J Clin Invest* 1992; 90:1614-1621.
77. Ogawa Y, Kobayashi T, Kariya S, Nishioka A, Nakayama K, Seguchi H, Yoshida S. Prevention of hydrogen peroxide-induced apoptosis of human

peripheral T cells by a lysosomotropic iron chelator, ammonium chloride. *Int J Mol Med* 2004; 14:1007-1013.

78. Osterud B, Bjorklid E. Sources of tissue factor. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32:11-23.
79. Ott I, Andrassy M, Zieglgansberger D, Geith S, Schomig A, Neumann FJ. Regulation of monocyte procoagulant activity in acute myocardial infarction: role of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor-1. *Blood* 2001; 97:3721-3726.
80. Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, Sajer SA, Furie B. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* 1992; 359:848-851.
81. Palmerini T, Collier BS, Cervi V, Tomasi L, Marzocchi A, Marrozzini C, Leone O, Piccioli M, Branzi A. Monocyte-derived tissue factor contributes to stent thrombosis in an in vitro system. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44:1570-1577.
82. Parry GC, Mackman N. Transcriptional regulation of tissue factor expression in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:612-621.
83. Pawlinski R, Pedersen B, Erlich J, Mackman N. Role of tissue factor in haemostasis, thrombosis, angiogenesis and inflammation: lessons from low tissue factor mice. *Thromb Haemost* 2004; 92:444-450.
84. Pozza LM, Austin RC. Getting a GRP on tissue factor activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:1529-1531.
85. Proskuryakov SY, Gabai VL, Konoplyannikov AG, Zamulaeva IA, Kolesnikova AI. Immunology of apoptosis and necrosis. *Biochemistry (Mosc)* 2005; 70:1310-1320.
86. Rabausch K, Bretschneider E, Sarbia M, Meyer-Kirchrath J, Censarek P, Pape R, Fischer JW, Schrör K, Weber AA. Regulation of thrombomodulin expression in human vascular smooth muscle cells by COX-2-derived prostaglandins. *Circ Res* 2005; 96:e1-e6.
87. Rana SV, Reimers HJ, Pathikonda MS, Bajaj SP. Expression of tissue factor and factor VIIa/tissue factor inhibitor activity in endotoxin or phorbol ester stimulated U937 monocyte-like cells. *Blood* 1988; 71:259-262.
88. Randolph GJ, Luther T, Albrecht S, Magdolen V, Muller WA. Role of tissue factor in adhesion of mononuclear phagocytes to and trafficking through endothelium in vitro. *Blood* 1998; 92:4167-4177.
89. Rao BG. Recent developments in the design of specific Matrix Metalloproteinase inhibitors aided by structural and computational studies. *Curr Pharm Des* 2005; 11:295-322.
90. Rao LV, Pendurthi UR. Tissue factor-factor VIIa signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:47-56.

91. Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, Badimon JJ, Hember J, Riederer MA, Nemerson Y. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood* 2000; 96:170-175.
92. Rauch U, Osende JI, Fuster V, Badimon JJ, Fayad Z, Chesebro JH. Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences. *Ann Intern Med* 2001; 134:224-238.
93. Riewald M, Ruf W. Mechanistic coupling of protease signaling and initiation of coagulation by tissue factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:571-576.
94. Rovida E, Paccagnini A, Del Rosso M, Peschon J, Dello SP. TNF-alpha-converting enzyme cleaves the macrophage colony-stimulating factor receptor in macrophages undergoing activation. *J Immunol* 2001; 166:1583-1589.
95. Ruf W, Dorfleutner A, Riewald M. Specificity of coagulation factor signaling. *J Thromb Haemost* 2003; 1:1495-1503.
96. Ruf W, Edgington TS. Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo. *FASEB J* 1994; 8:385-390.
97. Schechter AD, Giesen PL, Taby O, Rosenfield CL, Rossikhina M, Fyfe BS, Kohtz DS, Fallon JT, Nemerson Y, Taubman MB. Tissue factor expression in human arterial smooth muscle cells. TF is present in three cellular pools after growth factor stimulation. *J Clin Invest* 1997; 100:2276-2285.
98. Schechter AD, Spirn B, Rossikhina M, Giesen PL, Bogdanov V, Fallon JT, Fisher EA, Schnapp LM, Nemerson Y, Taubman MB. Release of active tissue factor by human arterial smooth muscle cells. *Circ Res* 2000; 87:126-132.
99. Schlomann U, Wildeboer D, Webster A, Antropova O, Zeuschner D, Knight CG, Docherty AJ, Lambert M, Skelton L, Jockusch H, Bartsch JW. The metalloprotease disintegrin ADAM8. Processing by autocatalysis is required for proteolytic activity and cell adhesion. *J Biol Chem* 2002; 277:48210-48219.
100. Schlondorff J, Blobel CP. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci* 1999; 112 (Pt 21):3603-3617.
101. Seals DF, Courtneidge SA. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 2003; 17:7-30.
102. Seljeflot I, Hurlen M, Hole T, Arnesen H. Soluble tissue factor as predictor of future events in patients with acute myocardial infarction. *Thromb Res* 2003; 111:369-372.
103. Sevinsky JR, Rao LV, Ruf W. Ligand-induced protease receptor translocation into caveolae: a mechanism for regulating cell surface proteolysis of the tissue factor-dependent coagulation pathway. *J Cell Biol* 1996; 133:293-304.
104. Siddiqui FA, Desai H, Amirkhosravi A, Amaya M, Francis JL. The presence and release of tissue factor from human platelets. *Platelets* 2002; 13:247-253.

105. Singer II, Scott S, Chin J, Bayne EK, Limjuco G, Weidner J, Miller DK, Chapman K, Kostura MJ. The interleukin-1 beta-converting enzyme (ICE) is localized on the external cell surface membranes and in the cytoplasmic ground substance of human monocytes by immuno-electron microscopy. *J Exp Med* 1995; 182:1447-1459.
106. Soejima H, Ogawa H, Yasue H, Kaikita K, Nishiyama K, Misumi K, Takazoe K, Miyao Y, Yoshimura M, Kugiyama K, Nakamura S, Tsuji I, Kumeda K. Heightened tissue factor associated with tissue factor pathway inhibitor and prognosis in patients with unstable angina. *Circulation* 1999a; 99:2908-2913.
107. Soejima H, Ogawa H, Yasue H, Kaikita K, Takazoe K, Nishiyama K, Misumi K, Miyamoto S, Yoshimura M, Kugiyama K, Nakamura S, Tsuji I. Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces monocyte chemoattractant protein-1 and tissue factor levels in patients with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1999b; 34:983-988.
108. Sorensen BB, Freskgard PO, Nielsen LS, Rao LV, Ezban M, Petersen LC. Factor VIIa-induced p44/42 mitogen-activated protein kinase activation requires the proteolytic activity of factor VIIa and is independent of the tissue factor cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 1999; 274:21349-21354.
109. Stampfuss JJ, Schrör K, Weber AA. Inhibition of platelet thromboxane receptor function by a thrombin receptor-targeted pepducin. *Nat Med* 2003; 9:1447-1448.
110. Stoneman VE, Bennett MR. Role of apoptosis in atherosclerosis and its therapeutic implications. *Clin Sci (Lond)* 2004; 107:343-354.
111. Sturk-Mauelin KN, Nieuwland R, Romijn FP, Eijssman L, Hack CE, Sturk A. Pro- and non-coagulant forms of non-cell-bound tissue factor in vivo. *J Thromb Haemost* 2003; 1:1920-1926.
112. Sunamura M, di Mario C, Piek JJ, Schroeder E, Vrints C, Probst P, Heyndrickx GR, Fleck E, Serruys PW. Cyclic flow variations after angioplasty: a rare phenomenon predictive of immediate complications. DEBATE Investigator's Group. *Am Heart J* 1996; 131:843-848.
113. Szasz R, Dale GL. COAT platelets. *Curr Opin Hematol* 2003; 10:351-355.
114. Szotowski B, Antoniuk S, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U. Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines. *Circ Res* 2005; 96:1233-1239.
115. Taylor FB, Chang AC, Peer G, Li A, Ezban M, Hedner U. Active site inhibited factor VIIa (DEGR VIIa) attenuates the coagulant and interleukin-6 and -8, but not tumor necrosis factor, responses of the baboon to LD100 Escherichia coli. *Blood* 1998; 91:1609-1615.
116. Tedgui A, Mallat Z. Smooth muscle cells : another source of tissue factor-containing microparticles in atherothrombosis? *Circ Res* 2000; 87:81-82.

117. Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM, Stanton JJ, Broze GJ, Jr. Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood* 1996; 88:1583-1587.
118. Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz SD, Fernandez-Ortiz A, Chesebro JH, Badimon L, Nemerson Y, Fuster V, Badimon JJ. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1997; 95:594-599.
119. Tutar E, Ozcan M, Kilickap M, Gulec S, Aras O, Pamir G, Oral D, Dandele L, Key NS. Elevated whole-blood tissue factor procoagulant activity as a marker of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty and stent implantation. *Circulation* 2003; 108:1581-1584.
120. Wang J, Weiss I, Svoboda K, Kwaan HC. Thrombogenic role of cells undergoing apoptosis. *Br J Haematol* 2001; 115:382-391.
121. Watson LM, Chan AK, Berry LR, Li J, Sood SK, Dickhout JG, Xu L, Werstuck GH, Bajzar L, Klamut HJ, Austin RC. Overexpression of the 78-kDa glucose-regulated protein/immunoglobulin-binding protein (GRP78/BiP) inhibits tissue factor procoagulant activity. *J Biol Chem* 2003; 278:17438-17447.
122. Weber AA, Hohlfeld T, Schrör K. Pharmakologie der Blutgerinnung 2006. *Biospektrum* 2006; 12:35-38.
123. Weber AA, Schrör K. The significance of platelet-derived growth factors for proliferation of smooth muscle cells. *Platelets* 1999; 10:77-96.
124. Wilcox JN, Rodriguez J, Subramanian R, Ollerenshaw J, Zhong C, Hayzer DJ, Horaist C, Hanson SR, Lumsden A, Salam TA, . Characterization of thrombin receptor expression during vascular lesion formation. *Circ Res* 1994; 75:1029-1038.
125. Wolberg AS, Monroe DM, Roberts HR, Hoffman MR. Tissue factor de-encryption: ionophore treatment induces changes in tissue factor activity by phosphatidylserine-dependent and -independent mechanisms. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1999; 10:201-210.
126. Zhao H, Bernardo MM, Osenkowski P, Sohail A, Pei D, Nagase H, Kashiwagi M, Soloway PD, DeClerck YA, Fridman R. Differential inhibition of membrane type 3 (MT3)-matrix metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP by tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 regulates pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem* 2004; 279:8592-8601.
127. Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997; 89:1121-1132.

7 Veröffentlichungen im Zusammenhang mit dieser Arbeit

7.1 Originalarbeiten

1. Stampfuss JJ, Schrör K, Weber AA. Inhibition of platelet thromboxane receptor function by a thrombin receptor-targeted pepducin. *Nat Med* 2003; 9:1447-1448. (Correspondence)
2. Stampfuss JJ, Schrör K, Weber AA. Green tea catechins containing a galloyl group in the 3' position inhibit tissue factor-induced thrombin generation. *Thromb Haemost* 2005; 93:1200-1201. (Letter to the editor)
3. Stampfuss JJ, Censarek P, Fischer JW, Schrör K, Weber AA. Rapid Release of Active Tissue Factor From Human Arterial Smooth Muscle Cells Under Flow Conditions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:e34-e37.
4. Stampfuss JJ, Censarek P, Fischer JW, Kaber G, Rauch BH, Schulze-Osthoff K, Schrör K, Weber AA. Down-Modulation of P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) in monocytes undergoing apoptosis. (*in Vorbereitung*)

7.2 Kongressbeiträge

1. Stampfuss JJ, Schrör K, Weber AA. Anti-thrombin receptor peptiducins inhibit collagen-induced platelet aggregation. *Hämostaseologie* 2004;24:A37.
2. Stampfuss JJ, Schrör K, Weber AA. Intravaskulärer Tissue Factor. X. *Kardiologisch-Hämostaseologischer Workshop, Solingen* 2004.
3. Stampfuss JJ, Censarek P, Weber AA, Schrör K. Shedding of tissue factor-bearing microparticles from smooth muscle cells under flow conditions. *Haemostaseologie* 2005;25:A15.
4. Stampfuss JJ, Weber AA, Sachinidis A, Schrör K. Inhibition of tissue factor-induced thrombin generation by different green tea catechins. *Haemostaseologie* 2005;25:A48.
5. Stampfuss JJ, Censarek P, Bobbe A, Schrör K, Weber AA. Specific membrane environment rather than expression level of tissue factor determines thrombin formation triggered by monocytic cells undergoing apoptosis. *Circulation* 2005;112(Suppl.):1478. (Finalist for the Scientific Sessions 2005 Poster Competition in Basic Science).
6. Stampfuss JJ, Censarek P, Bobbe A, Schrör K, Weber AA. Rapid release of active tissue factor from human vascular smooth muscle cells under flow conditions. *Circulation* 2005;112(Suppl.):632.
7. Stampfuss JJ, Censarek P, Rauch BH, Fischer JW, Schrör K, Weber AA. Apoptosis leads to a shedding of P-selectin glycoprotein ligand (PSGL-1) from monocyte surface resulting in a complete loss of PSGL-1 function. *Hämostaseologie* 2006; 26:A54.
8. Stampfuss JJ, Censarek P, Fischer JW, Schrör K, Weber AA. Humane arterielle glatte Gefäßmuskelzellen sind eine wichtige Quelle für zirkulierenden Tissue-Faktor unter Flussbedingungen. *Clin Res Cardiol* 2006; 95(Suppl 5):P203.

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Karsten Schrör danke ich für die herzliche Aufnahme in das Institut und die Unterstützung dieser Arbeit. Besonders möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, an wissenschaftlichen Kongressen teilnehmen zu können, und die damit verbundene großzügige Unterstützung.

Herrn PD Dr. Artur-Aron Weber danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Viele anregende Gespräche brachten neue Sichtweisen und Denkansätze hervor.

Frau Prof. Dr. Lär danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Kerstin Freidel danke ich für die experimentelle Unterstützung und ständige Hilfsbereitschaft im Laboralltag. Beate Weyrauther danke ich für die tatkräftige Unterstützung in der Zellkultur. Petra Kuger und Frau Reupert danke ich für die methodische Unterstützung und die sehr nette Hilfsbereitschaft.

Erika Lohmann und Karin Montag danke ich herzlich für die Organisation des Institutslebens.

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

Gernot Kaber und Sören Twarock möchte ich für die äußerst angenehme Gestaltung des Büroalltags und viele wertvolle Diskussionen danken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Freundin Christina für die liebe Unterstützung bei dieser Arbeit.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes danke ich für die ideelle und finanzielle Förderung dieses Projekts.

9 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die vorliegende Doktorschrift selbständig 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

(Jan Julius Stampfuß)

10 Lebenslauf

Person:

Name: Jan Julius Stampfuß

Geburtsdatum: 10.09.1976

Geburtsort: Bottrop

Promotion:

Seit 02/2003 Promotion unter der Leitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. Artur-Aron Weber am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf

Seit 04/2004 Promotionsstipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes

Studium:

1997 - 2001 Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg

2001 - 2002 Praktisches Jahr in Salt Lake City (USA) und in Hamburg

12/2002 Approbation zum Apotheker

Zivildienst:

1996 - 1997 Betreuung verhaltensauffälliger Kinder im Wichernhaus des Diakonischen Werks in Bottrop

Schule:

1983 - 1987 Grundschule in Bottrop

1987 - 1996 Gymnasium und Abitur in Bottrop