

**Bedeutung der myokardialen Tissue Factor-Expression
für die myokardiale Struktur und Thrombogenität bei der
inflammatorischen Kardiomyopathie.**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Silvio Antoniak

aus Strausberg

Juni 2008

1. Gutachter: Prof. Dr. Ursula Rauch-Kröhnert
2. Gutachter: Prof. Dr. Mathias F. Melzig

Disputation: 23.10.2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Bedeutung des Proteins „Tissue Factor“ in der Hämostase	2
1.2	Regulationsmechanismen der extrinsischen Blutgerinnung	4
1.3	Die Funktionen von Tissue Factor neben der Hämostase	6
1.4	Die Struktur und transkriptionelle Regulation des Tissue Factor-Gens	7
1.5	Die Proteinstruktur von Tissue Factor	9
1.6	Die Zelluläre Lokalisation und die Bedeutung des im Blut zirkulierenden Tissue Factor-Proteins	11
1.7	Die Bedeutung der Tissue Factor-Expression im Herzen	13
1.8	Die Inflammatorische Kardiomyopathie und das Thromboserisiko	15
2	Zielsetzung	19
3	Material	20
3.1	Chemikalien und Substanzen	20
3.2	Kits	22
3.3	Medien und Zusätze	22
3.4	Lösungen	24
3.5	Enzyme	24
3.6	Vektoren	25
3.7	Zellen	25
3.8	Tierstämme	25
3.9	Antikörper	25
3.10	Primer und Bedingungen für die Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
3.11	Geräte	29
3.12	Sonstige Materialien	30
4	Methoden	31
4.1	Tiermodell einer CVB3-Myokarditis	31
4.2	Untersuchungen an humanen Endomyokardbiopsien	32
4.3	Zellkulturexperimente	34
4.3.1	Zellkultur von Zelllinien	34
4.3.2	Isolation von primären neonatalen Kardiomyozyten der Maus	35
4.3.3	Einfrieren, Lagerung und Auftauen von Zellen	36
4.3.4	Vitalitätstest und Kontaminationsanalyse	36

4.3.5	Stimulation der Zellen	37
4.4	Extraktion von RNA und Synthese von cDNA	37
4.4.1	RNA-Isolation aus Zellen und Gewebe	37
4.4.2	RNA-Quantifizierung und -Qualitätskontrolle	38
4.4.3	Synthese der cDNA	38
4.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
4.5.1	PCR aus cDNA	40
4.5.2	PCR aus Plasmid-DNA (Kolonie-PCR)	40
4.6	DNA-Gelelektrophorese	40
4.7	Qualitative Real-time PCR (TaqMan®)	41
4.7.1	TaqMan® Real-time PCR mit SYBR® Green I	42
4.7.2	PreAmp TaqMan® Real-time PCR	42
4.7.3	LowDensity-Array	43
4.8	Immunohistochemie und Fluoreszenzfärbungen	43
4.9	Durchflusszytometrie	46
4.9.1	Fluoreszenzmarkierung von Zellen	47
4.10	Isolation und Quantifizierung von Mikropartikel	48
4.11	Bestimmung der Tissue Factor-Proteinaktivität	49
4.11.1	Zelluläre und Mikropartikel-assoziierte Tissue Factor-Aktivität	49
4.11.2	Herstellung von Phospholipidvesikeln	50
4.11.3	Tissue Factor-Aktivität in Blutplasma	51
4.12	Analysen zum Wachstumsverhalten von Zellen	51
4.12.1	Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit mit CFSE	51
4.12.2	Zellzyklus-Analyse mittels Propidiumiodid-Anfärbung	52
4.12.3	Expressionsanalyse des Proliferationsmarkers Ki67	52
4.13	Apoptoseassays	52
4.14	Protein-biochemische Analysen	53
4.14.4	RhoA-Aktivitätsassay	55
4.15	Klonierung von DNA-Fragmenten	56
4.15.1	Restriktionsenzymverdau	57
4.15.2	Ligation	57
4.15.3	Generierung von short-hairpin RNA Vektoren	58
4.15.4	Chemische Transformation	58
4.15.5	Dauerkulturen	59

4.15.6	Plasmidisolierung	59
4.16	Transfektion von eukaryotischen Zellen	59
4.17	Angewandte Programme und statistische Auswertung	61
5	Ergebnisse	63
5.1	Das Mausmodell der CVB3-induzierten Myokarditis	63
5.1.1	Der immunhistologische Nachweis von Fibrin und Infiltraten im Myokard	63
5.1.2	Die Veränderung der hämodynamischen Parameter infolge einer CVB3-Infektion	65
5.1.3	Die Veränderung der myokardialen Tissue Factor-Expression in Relation zur myokardialen Entzündungsreaktion	66
5.1.4	<i>In situ</i> -Nachweis von aktivierten Tissue Factor	70
5.1.5	Die Thrombogenität des Blutes im Verlauf der Myokarditis	73
5.2	Die Tissue Factor-Expression im Herzen bei Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie	74
5.2.1	Charakterisierung der Patientenkollektive	74
5.2.2	Die Tissue Factor-Expression und der Nachweis der myokardialen Entzündungsreaktion im untersuchten Patientenkollektiv	75
5.2.3	Die myokardiale Tissue Factor-Expression in Abhängigkeit zur Virusinfektion	77
5.2.4	Tissue Factor-Expression und myokardiale Entzündungsreaktion	78
5.2.5	Assoziation der myokardialen Tissue Factor-Expression mit krankheitsrelevanten Markern	79
5.3	Die Regulation der Tissue Factor-Genexpression in Kardiomyozyten	81
5.3.1	Die kardiomyozytäre Tissue Factor-Expression nach Stimulation mit TNF- α	82
5.3.2	Die Entstehung von kardiomyozytären Mikropartikeln via RhoA-Aktivierung	87
5.3.3	Die Bedeutung kardiomyozytärer Mikropartikel für die Thrombogenität des extrazellulären Raumes	90
5.3.4	Die Mikropartikel-Entstehung in Assoziation mit der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts	91

5.3.5	Diffusion von kardiomyozytären Mikropartikeln durch das Endothel	92
5.3.6	Zirkulierende Mikropartikel im Plasma von Patienten mit akuten myokardialen Verletzungen	94
5.4	Der Einfluss der Tissue Factor-Expression auf das zelluläre Überleben von Kardiomyozyten unter inflammatorischen Bedingungen	95
5.4.1	Der Zusammenhang zwischen der Wachstumsgeschwindigkeit und der zellulären Tissue Factor-Expression	96
5.4.2	Der Zusammenhang zwischen der Tissue Factor-Expression und der zellulären Apoptose	97
6	Diskussion	102
6.1	Die Tissue Factor-Expression im mit CVB3-infizierten Herzen	102
6.2	Die Tissue Factor-Expression im entzündeten humanen Herzen	108
6.3	Die transkriptionelle Regulation der Tissue Factor-Expression im Kardiomyozyten	113
6.4	Der Tissue Factor-vermittelte Schutz der Kardiomyozyten vor Apoptose	117
6.5	Ausblick	121
7	Zusammenfassung	122
8	Summary	125
9	Abkürzungen	127
10	Literatur	130
11	Publikationen	150
12	Danksagung	156
13	Lebenslauf	157

1 Einleitung

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist eine humane Herzmuskelerkrankung, die durch eine Reduktion der links- und rechtsventrikulären Funktion bei gleichzeitiger Dilatation des linken und rechten Ventrikels charakterisiert ist. Jüngste Untersuchungen zeigten, dass die DCM neben der koronaren Herzerkrankung eine der häufigsten Ursachen einer Herzinsuffizienz darstellt (Matoba et al., 2004). Die inflammatorische DCM wird als DCM mit myokardialer Entzündung definiert, welche oftmals durch eine virale Infektion verursacht wird (Richardson et al., 1996). Als Komplikationen sind Reizleitungsstörungen im Herzen, Arrhythmien, Kardiomegalie, Herzinsuffizienz und Thromboembolien bekannt. Trotz neuerer Therapiemaßnahmen liegt bei einer DCM die 5-Jahres-Mortalität um die 50%. Ferner wurde festgestellt, dass die Entwicklung einer Herzinsuffizienz das Thromboserisiko erhöht (Tomioka et al., 1985).

Zur Erhaltung einer effektiven Hämostase in stark durchbluteten Organen wie dem Herz ist die Expression von Tissue Factor (TF) essentiell. Die TF-Expression im Herzen schützt vor lokalen Einblutungen, die aufgrund der ständigen mechanischen Belastung des Myokards entstehen können. In Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurde beobachtet, dass der myokardiale TF-Proteingehalt im humanen insuffizienten DCM- Herzen vermindert war (Szotowski et al., 2005b). Die myokardiale TF-Expression korrelierte positiv mit der Herzpumpfunktion, jedoch war keine Assoziation mit einer ventrikulären Dilatation in den untersuchten insuffizienten Herzen vorhanden (Szotowski et al., 2005b). Ferner wurde eine zelluläre Umverteilung von TF vom Sarkolemm und den Z-Bändern in das Zytosol und das kernnahe Zytoplasma der Kardiomyozyten beobachtet (Szotowski et al., 2005b). Diese Daten lassen vermuten, dass eine Reduktion des myokardialen TF-Gehalts und die intrazelluläre Umverteilung die strukturelle Integrität des Herzens beeinflussen und möglicherweise zur kardialen Dysfunktion beim Vorliegen einer DCM beitragen können. Im Gegensatz zu Lunge, Gehirn und Niere wurde bei Stimulationsversuchen mit Lipopolysacchariden (LPS) *in vitro* und *in vivo* eine reduzierte TF-mRNA-Expression in Kardiomyozyten nachgewiesen (Mackman et al., 1993; Erlich et al., 1999; Luther et al., 2000). Diese Daten der herzspezifischen Regulation des TF-Gens, lassen auf eine potentielle Bedeutung von TF für den Erhalt der kardialen Muskelstruktur und Funktion im Herzen vermuten.

1.1 Die Bedeutung des Proteins „Tissue Factor“ in der Hämostase

Morawitz stellte erstmalig eine Theorie zur Blutgerinnung auf und verwendete den Begriff Thrombokinase als Bezeichnung der gewebsspezifischen Substanz, die die Blutgerinnung beeinflusst (Morawitz, 1905). Er postulierte zwei Quellen für die Thrombokinase: 1.) Plättchen und Leukozyten geben Thrombokinase bei längerer Stase des Blutes ab, und 2.) nach einer Gefäßverletzung tritt gewebständige Thrombokinase mit dem Blut in Kontakt. Nolf prägte den Begriff Thromboplastin für die Thrombokinase und Howell die heute gebräuchliche Bezeichnung Tissue Factor (Howell, 1935; Nolf, 1938). Im Rahmen einer einheitlichen Nomenklatur wird Thromboplastin als Tissue Factor (TF, Faktor III, CD 142) bezeichnet. Es wurden zu der Zeit zwei verschiedene Thromboplastine postuliert, ein Plasma- und ein Gewebs-Thromboplastin. Plasma-Thromboplastin wurde aktiviert, wenn Plasma mit fremden, negativ-geladenen Oberflächen in Kontakt trat. Es wurde angenommen, dass die Faktoren VIII, IX, XI, X, XII aktiviert und mit Kalzium, Blutplättchen und Phospholipiden interagieren. Gewebs-Thromboplastin reagiert als Lipoprotein mit den Faktoren VII, X und V sowie mit Prothrombin und Kalzium (MacFarlane, 1972). Im Hinblick auf die Gerinnungsabläufe wurden die Begriffe „Wasserfall-“ oder „Kaskaden-Theorie“ geprägt. Dabei lag damals der Konsens vor, dass jeder Gerinnungsfaktor als ein zunächst inaktives Proenzym vorliegt und während des kaskadenartigen Ablaufs aktiviert wird wodurch nachfolgende Proenzyme gespalten werden (Davie und Ratnoff 1964, MacFarlane 1964). TF bildet einen Komplex mit FVII/FVIIa, Phospholipiden und Kalzium und wandelt dadurch FX in das aktive Enzym FXa um (Nemerson, 1966; Williams und Norris, 1966). Der TF/FVIIa-Komplex gilt heute als der Initiator der Blutgerinnung (Rapaport und Rao, 1995).

Bach et al. gelang es, das TF-Protein aus Geweblysaten zu isolieren (Bach et al., 1981). 1987 publizierten vier Gruppen unabhängig voneinander die proteinkodierende TF-mRNA-Sequenz (Fisher et al., 1987; Morrissey et al., 1987; Scarpati et al., 1987; Spicer et al., 1987). Die Publikation der gesamten genomischen Sequenz folgte zwei Jahre später (Mackman et al., 1989). TF wurde extravaskulär in verschiedenen menschlichen Geweben/Organen nachgewiesen wie z.B. im Gehirn, Herzen, Lunge, Niere, Leber, Milz und Haut (Drake et al., 1989; Fleck et al., 1990). Die TF-Expression in vitalen Organen schützt vor spontanen Blutverlusten.

Einleitung

Die Gerinnung mit ihren einzelnen Komponenten wurde bislang in das extrinsische (TF-aktivierte) und das intrinsische (Kontakt-aktivierte) System aufgeteilt. Das intrinsische Koagulationssystem wird nach Kontakt mit anionischen Oberflächen (z. B. der Wand eines Reagenzglases) durch Aktivierung des Gerinnungsfaktors XII, der im Blut vorhanden ist, ausgelöst. Beide Wege führen zur Bildung von FXa, der Prothrombin aktiviert, was letztendlich zur Fibrinbildung führt. Die Entdeckung, dass ein dem intrinsischen System zugeordneter Gerinnungsfaktor (FIX) auch durch den TF/FVIIa-Komplex aktiviert werden kann, lässt eine exakte Trennung zwischen extrinsischen und intrinsischen Blutgerinnungssystem nicht mehr zu (Osterud und Rapaport, 1977; Nemerson und Bach, 1982; Bauer et al., 1990; Bom et al., 1991; Rapaport und Rao, 1992). Ferner ist Thrombin in der Lage, FXI zu aktivieren, ohne dass es einer Aktivierung von FXII bedarf (Naito und Fujikawa, 1991; Gailani und Broze, Jr., 1993; Broze, Jr. und Gailani, 1993). Nach dem heutigen Kenntnisstand hat das intrinsische System vorwiegend bei Kontakt von Blut mit künstlichen Oberflächen eine Bedeutung (Courtney und Forbes, 1994).

Membranständiger vaskulärer TF ist Rezeptor und Ko-Faktor für FVII oder dem im Blut zirkulierenden aktivierten FVII (FVIIa) (Bach, 1988; Nemerson, 1988; Rapaport, 1991; Carson und Brozna, 1993). Diese Interaktion steigert die Reaktionsgeschwindigkeit und katalytische Fähigkeit des TF/FVIIa-Komplexes zur Aktivierung weiterer Gerinnungsfaktoren extrem. Durch die Aktivierung von FIX und FX entstehen geringe Mengen Thrombin, die zu einer initialen Aktivierung der Thrombozyten und der Ko-Faktoren V (Esmon, 1979) und VIII (Eaton et al., 1986) führen. Die Gerinnung wird dann über einen positiven Rückkopplungsmechanismus verstärkt, wobei FVIIIa mit FIXa auf der Membranoberfläche der Plättchen einen Komplex bilden, der eine 50- bis 100-fach größeren Menge an FXa im Vergleich zum TF/FVIIa-Komplex generiert (Abbildung 1).

Darüber hinaus bildet FXa mit FVa und Prothrombin den sogenannten Prothrombinase-Komplex (Nemerson und Bach, 1982; Kalafatis et al., 1994), was eine 25-fachen Verstärkung der Thrombinbildung und letztendlich die Bildung eines stabilen Fibringerinnsels zur Folge hat. Daher reichen bereits geringe Mengen von TF, dem Initiator der Blutgerinnung, aus, um ein Gefäß mit einem Blutgerinnsel zu verschließen (Abbildung 1).

Einleitung

wurde beobachtet, dass Kardiomyozyten ebenfalls eine Quelle für TFPI sein können (Bajaj et al., 1999; Shimokawa et al., 2000).

TFPI-1 ist ein Glykoprotein mit drei Kunitz-Typ-Domänen (Abbildung 2), die hoch konservierte Strukturen vieler Serinprotease-Inhibitoren darstellen (Broze, Jr., 1995). TFPI-1 liegt bis zu 80% über Glukosamine an der Zelloberfläche gebunden vor. Der überbleibende Anteil zirkuliert Lipoprotein-assoziiert im Plasma oder ist in speziellen Granula der Plättchen gespeichert (Novotny et al., 1989; Sandset, 1996). Im Gegensatz zu Antithrombin III, welches den TF/FVIIa-Komplex dissoziieren lässt (Rao et al., 1995), bildet TFPI-1 einen reversiblen Komplex mit TF/FVIIa/FXa oder bindet erst FXa, welcher dann, wie in Abbildung 2 gezeigt, mit dem TF/FVIIa-Komplex interagiert. TFPI-1 hemmt durch seine Bindung die FXa-vermittelte Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin.

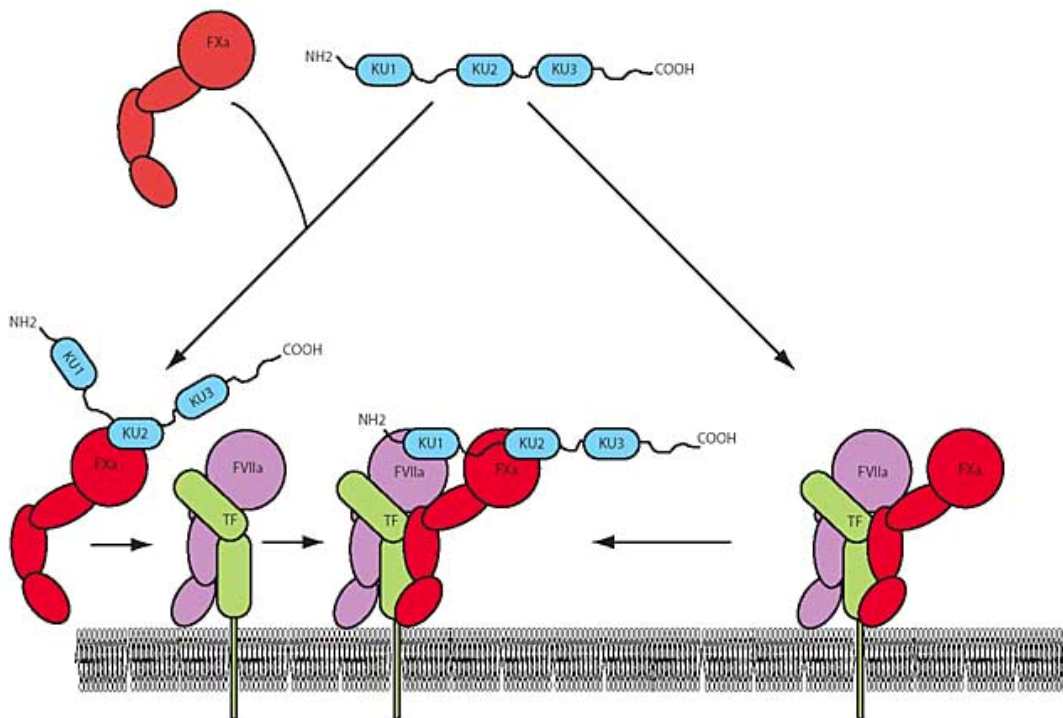


Abbildung 2. Inhibition des TF/FVIIa/FXa-Komplexes durch TFPI-1. TFPI-1 kann entweder direkt den TF/FVIIa/FXa-Komplex inhibieren oder es bindet freien FXa, welcher dann mit TF/FVIIa komplexiert. Die erste Kunitz-Domäne (KU1) von TFPI-1 bindet FVIIa und KU2 FXa. Die Rolle der letzten Kunitz-Domäne (KU3) ist bisher unbekannt, ist jedoch für die volle anti-thrombotische Aktivität notwendig. Über das positive geladene C-terminale Ende wird TFPI-1 durch Glukosamine an die Zellmembran gebunden (Gomez und McVey, 2006).

TNF- α und Endotoxin induzieren die Expression des anti-fibrinolytischen Faktors, Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1) und senken die Expression von Plasminogen Aktivator und Thrombomodulin, was letztendlich zu einer Erhöhung des thrombotischen Potentials führt (Sawdey et al., 1989; Lentz et al., 1991). He et al. zeigten, dass die TFPI-Expression und -Aktivität beim akuten ischämischen Schlaganfall, im Gegensatz zum TF, reduziert war (He et al., 2002). Ferner wurde beobachtet, dass TNF- α die myokardiale TFPI-1-Expression im Mausmodell *in vivo* reduziert und dadurch möglicherweise Mikrothrombosen im Herzgewebe verursachen kann (Shimokawa et al., 2000).

1.3 Die Funktionen von Tissue Factor neben der Hämostase

Neben seiner Bedeutung als Initiator der physiologischen Blutgerinnung ist TF bei Entstehung postoperativer Thrombosen (Osterud, 1998) und der Arteriosklerose beteiligt (Marutsuka et al., 2005). Im Verlauf der letzten Jahre wurden weitere Funktionen des TF-Proteins neben der Hämostase entdeckt. So spielt das Protein eine bedeutende Rolle während der Angiogenese bei der Embryonalentwicklung (Carmeliet et al., 1996; Bugge et al., 1996) sowie bei der pathologischen Blutgefäßbildung bei Tumorerkrankungen, der Tumorprogression und -metastasierung (Zhang et al., 1994; Shoji et al., 1998; Belting et al., 2005). TF ist ebenfalls an der Migration bzw. Transmigration von monozytären Zellen durch Endothelzellen (Muller und Randolph, 1999) und der Migration von glatten Muskelzellen (Pyo et al., 2004) sowie der Wundheilung (Nakagawa et al., 1998) beteiligt. Bei Sepsis-Patienten stellte man eine erhöhte TF-Expression in verschiedenen Geweben und im Plasma fest. Diese Erhöhung war assoziiert mit der Entstehung einer disseminierten intravaskulären Gerinnung und einer verstärkten Entzündungsreaktion, wodurch die Mortalität bei den Patienten signifikant anstieg (Levi und ten Cate, 1999; Levi et al., 2006). Die beobachteten Eigenschaften von TF werden entweder durch seine Funktion im Gerinnungssystem und/oder durch die TF-vermittelte zelluläre Signaltransduktion erklärt (Spek, 2004; Versteeg und Ruf, 2006; Monroe und Key, 2007).

1.4 Die Struktur und transkriptionelle Regulation des Tissue Factor-Gens

Die Struktur des TF-Gens wurde zwei Jahre nach Veröffentlichung der mRNA-Sequenz durch Mackman et al. publiziert (Mackman et al., 1989). Beim Menschen ist TF in einem 12,4 kb großen Gen kodiert, welches durch fünf Introns in sechs proteinkodierende Exons geteilt wird (Mackman et al., 1989). Das humane Gen für TF ist auf dem Chromosom 1 1p22-23 lokalisiert (Carson et al., 1985; Kao et al., 1988). Das TF-Gen der Maus ist 11 kb groß, liegt auf Chromosom 3 und weist die gleiche genomische Struktur wie das humane TF-Gen auf (Mackman et al., 1992).

Der Promoter des TF-Gens, wie in Abbildung 3 schematisch dargestellt, ist in den untersuchten Spezies hoch konserviert (Mackman et al., 1992). Er beinhaltet zwei Bindemotive für den Transkriptionsfaktor Aktivator-Protein-1 (AP-1), eine κ B-Bindestelle (Nukleärer Faktor κ B (NF κ B), cRel/p65), drei *early growth response factor 1* (Egr-1) und fünf Sp1-Motive (Sp1_{I-V}) (Mackman, 1995). Des Weiteren wurde eine Erkennungssequenz für den nukleären Faktor von aktivierten T-Zellen (NFAT), welche mit der κ B-Sequenz überlappt, beschrieben (Armesilla et al., 1999) (Abbildung 3). Der Methylierungsgrad von CpG-Inseln in der untranslatierten Region des TF-Promoters unterdrückt in verschiedenen Zelltypen wie B- und T-Lymphozyten die TF-Expression (Mackman et al., 1989).

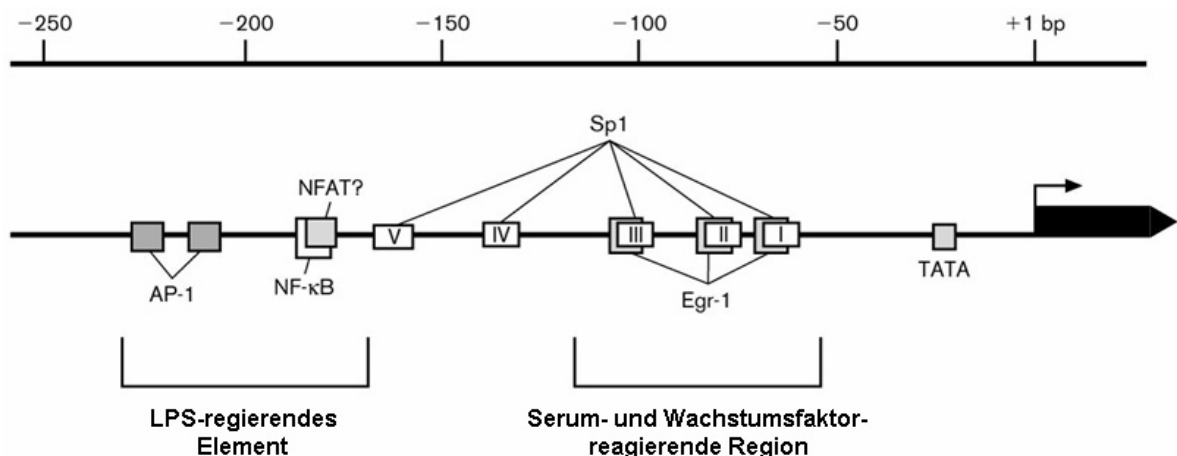


Abbildung 3. Schematische Darstellung des humanen TF-Promoters. Es sind die bekannten Bindestellen der unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren angezeigt (AP-1: Aktivator-Protein-1; NF κ B: Nukleärer Faktor κ B; Egr-1: *early growth response factor 1*; NFAT: nukleären Faktor von aktivierten T-Zellen). Der Transkriptionsstart ist als Pfeil angegeben. Nähere Erläuterungen im Text (Eilertsen und Osterud, 2004).

TF wird konstitutiv von verschiedenen Zellen wie zum Beispiel Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Epithelzellen und Kardiomyozyten exprimiert (Szotowski et al., 2006). Im menschlichen TF-Promoter werden den Sp1-Bindestellen cis-aktivierende Eigenschaften für die basale Promoteraktivität zugeschrieben (Cui et al., 1996). Die Sp1_{III-V}-Motive sind innerhalb der verschiedenen Spezies Mensch, Maus, Ratte und Schwein hoch konserviert (Mackman, 1995). Sp1 ist ein konstitutiv exprimiertes nukleäres Aktivatorprotein, welches in eukaryotischen Zellen die Gentranskription initiiert, indem sich ein funktionaler Präinitiiierungskomplex aus RNA Polymerase II, Aktivatorproteinen wie Sp1 und der Ziel-DNA-Sequenz formiert. Die Sp1-Bindestellen wirken additiv, mindestens zwei abgedeckte Motive sind für die basale Expression notwendig (Mackman, 1995). Ferner sind die AP-1 erkennenden Transkriptionsfaktoren c-Jun/JunD und c-Fos in der Basalexpression involviert (Oeth et al., 1997).

Innerhalb des humanen TF-Promoters wurden zwei regulative Regionen identifiziert, die für die induzierte TF-Expression verantwortlich sind (Abbildung 3). Diese beiden Regionen wurden auch im TF-Promoter der Maus nachgewiesen. Die erste ist eine 56 Basenpaare (bp) distale Enhancer Region (-227 bis -172), auch LPS-reagierendes Element genannt. Das LPS-reagierende Element beinhaltet die AP-1, κ B und NFAT Motive (Mackman, 1995; Oeth et al., 1997; Armesilla et al., 1999). In Zellkulturexperimenten wurde gezeigt, dass diese Region für die Induktion der TF-Expression durch LPS, Phorbolester (PMA), IL-1 β und TNF- α verantwortlich ist (Mackman et al., 1991; Parry und Mackman, 1995; Oeth et al., 1997). Die zweite Region, die proximal Serum-reagierende Region (-109 bis -59), enthält drei Egr-1 Motive. Diese Region vermittelt die transkriptionelle Aktivierung des TF-Gens als Ergebnis nach Behandlung mit Serum, Oberflächenscherkräften, *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), PMA, oxidiertem *low density* Lipoprotein (LDL) und LPS (Eilertsen und Osterud, 2004). Generell ist eine kooperative Aktivierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren für die induzierte TF-Expression notwendig. Die dabei involvierten Proteine können sich nach Art des Stimulus und der untersuchten Zelle unterscheiden.

1.5 Die Proteinstruktur von Tissue Factor

Das humane TF-Gen wird in ein etwa 2,3 kb großes mRNA-Transkript abgelesen und später in eine 295 Aminosäure (AS)-Kette translatiert. Das unreife Protein enthält eine 32 AS-lange Signalsequenz, die später abgespalten wird. Das fertig prozessierte Protein besteht aus 263 AS. Dabei bilden N-terminal 219 AS die hydrophile extrazelluläre Domäne, gefolgt von dem hydrophoben, transmembranären Abschnitt (23 AS) und dem kurzen zytoplasmatischen Ende (21 AS) (Szotowski et al., 2006). TF ist ein Typ I integrales Membranprotein (N-Terminus extrazellulär, C-Terminus intrazellulär) und gehört, basierend auf seiner strukturellen Homologie, zu den Interferon- γ -Rezeptoren. Aufgrund seines Proteinaufbaus wird TF den Klasse-II Zytokin-Rezeptoren zugeordnet (Bazan, 1990). Der extrazelluläre Teil formt zwei fibronektinähnliche β -Faltblätter, woran sich der TF-Ligand FVII/VIIa anlagert. Die extrazelluläre Domäne enthält des Weiteren vier potentielle N-verbundene Glykosylierungsstellen. Drei (Asn₁₁, Asn₁₂₄ and Asn₁₃₇) werden durch post-translationale Anlagerungen von Glykanresten besetzt (Boys et al., 1993). Diese post-translatorische Modifikation beeinflusst jedoch nicht die prokoagulatorische Aktivität des TF-Proteins. Ein Cysteinrest (Cys₂₄₅) im intrazellulären Teil wird über ein Thioester mit Palmitat verbunden und vermittelt dadurch die Verankerung innerhalb der Membran und die Assoziierung mit *Lipid Rafts* (Bach et al., 1988). Die in der extrazellulären Domäne vorhandenen vier Cysteinreste bilden zwei intramolekulare Disulfidbrücken, welche wichtig für die Interaktion von TF mit seinem Liganden FVII/VIIa und die Ko-Faktorfunktion sind (Ruf und Edgington, 1994). Untersuchungen zeigten, dass besonders die Disulfidbrücke zwischen Cys₁₈₆ und Cys₂₀₉ für die prokoagulative Aktivität von TF (FVIIa-Bindung) wichtig ist (Rehemtulla et al., 1991). Die Komplexbildung von TF mit FVIIa führt zur allosterischen Aktivierung von FVIIa und verstärkt die proteolytische Aktivierung von FX um den Faktor 2×10^7 im Vergleich zu FVIIa allein (Edgington et al., 1997). Weiterhin steigert TF die Aktivierbarkeit von FVII durch FXa, FIXa, Thrombin und den TF/FVIIa Komplex (Broze, Jr. und Majerus, 1980; Bajaj et al., 1981; Davie et al., 1991). Für die maximale Aktivität des TF/FVIIa-Komplexes wird eine Assoziierung mit negativ-geladenen Phospholipiden benötigt (Paborsky et al., 1991).

Einleitung

Von Bogdanov und Mitarbeitern wurde eine weitere TF-Isoform beim Menschen und später bei der Maus beschrieben (Bogdanov et al., 2003; Bogdanov et al., 2006). Die Erstbeschreibung erfolgte an humanen HL-60 Zellen, bei denen eine durch alternatives Spleißen gebildete mRNA nachgewiesen wurde (Bogdanov et al., 2003). Dieser mRNA fehlt das fünfte Exon. Daraus resultiert ein Protein aus 206 AS, das den größten Teil der extrazellulären Domäne der ursprünglich bekannten *full-length* (fl) Variante besitzt. Durch den Verlust des fünften kodierenden Exons fehlt der alternativ-gespleißten TF-Isoform (asTF) die transmembranäre Domäne, somit ist asTF löslich. Da das Exon 4 mit einem unvollständigen Triplet endet, wird ein Leserahmenverschub verursacht, und es entsteht nach Translation der mRNA ein neues 40 AS-langes C-terminales Ende. Die beiden Lysine (165-66), die für die Interaktion der extrazellulären Domäne mit FVIIa notwendig sind, bleiben erhalten (Kelley et al., 1995).

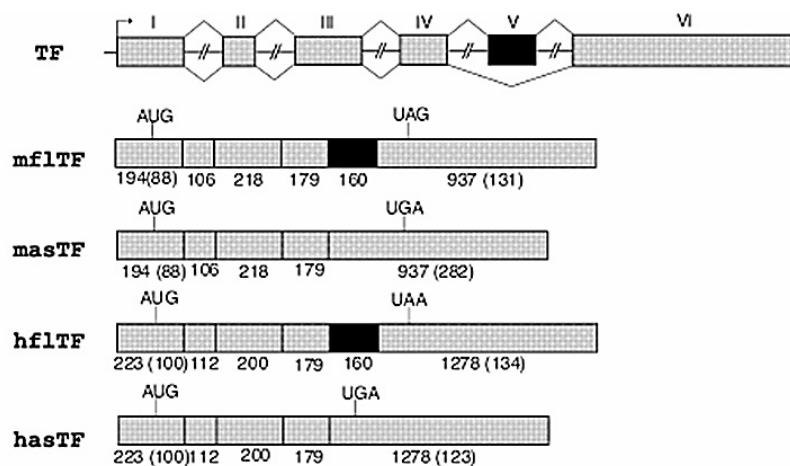


Abbildung 4. Vereinfachte Darstellung der verschiedenen TF-mRNA-Transkripte, die in fertige Proteine umgeschrieben werden. Das TF-Gen besteht aus sechs Exons, die durch alternatives Spleißen des Transkriptes in ein membranständiges flTF-Protein und ein lösliches (asTF) Protein umgeschrieben werden. Die römischen Zahlen zeigen die einzelnen Exone an. Die arabischen Zahlen geben die Exonlänge in Nukleotiden an. In der Abbildung ist der Translationsstart (AUG) und das Translationsende (UAG; UAA, UGA) verzeichnet (mflTF: murines flTF; masTF: murines asTF; hflTF: humanes flTF; hasTF: humanes asTF) (Bogdanov et al., 2006).

AsTF konnte bisher in verschiedenen Geweben und Zelltypen nachgewiesen werden. Darunter befanden sich die Niere, das Gehirn, das Herz, die Inselzellen, die Plazenta, die Lunge und verschiedene Tumorzelllinien (Szotowski et al., 2006). In den untersuchten Geweben wurden schwankende Expressionsquotienten von flTF

zu asTF nachgewiesen. Diese Befunde lassen auf eine Regulation des TF-Spleißprozesses schließen (Bogdanov et al., 2003). Ferner war es uns möglich zu zeigen, dass kardiale Endothelzellen asTF exprimieren (Szotowski et al., 2005b).

Die später beschriebene murine asTF-Isoform wird in der adulten Maus in fast allen Geweben exprimiert (Bogdanov et al., 2006). Bemerkenswert war die Beobachtung, dass während der embryonalen Entwicklung asTF sehr stark in der ektodermalen Schicht des sich bildenden Herzens nachweisbar war. Parallel dazu wurde flTF im Endoderm nachgewiesen. In späteren Stadien der Entwicklung gleichen sich die Expressionsmuster von asTF und flTF an. Diese letzten Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass der Expressionslevel von asTF in den verschiedenen Geweben eher mit der TF-Genaktivität assoziiert sind, als mit einer unterschiedlichen Regulation des mRNA-Spleißprozesses (Bogdanov et al., 2006).

Zusätzlich zu den oben beschriebenen beiden TF-Isoformen, die in ein funktionelles, reifes Protein translatiert werden, beschrieb Chand et al. eine weitere Spleißvariante (Chand et al., 2006). Die sogenannte TF-A-mRNA soll etwa 10% aller TF-Transkripte in Tumorzellen ausmachen. Bei der beobachteten Spleißvariante wird ein 495 bp großer Teil des ersten Introns an das erste Exon gespleißt (Chand et al., 2006). Im Gegensatz zu asTF führt die Translation von TF-A zu keinem reifen Protein. Chand et al. berichteten, dass Tumorzellen unterschiedliche mRNA-Expressionsraten aufwiesen (Chand und Kisiel, 2007).

1.6 Die Zelluläre Lokalisation und die Bedeutung des im Blut zirkulierenden Tissue Factor-Proteins

TF wird von vielen extravaskulären Zellen wie Fibroblasten, Perizyten, Astrozyten und Kardiomyozyten konstitutiv exprimiert (Drake et al., 1989; Fleck et al., 1990). Verschiedene stark durchblutete Organe wie das Herz, das Gehirn und die Nieren zeigen stellenweise ein hohes TF-Expressionsmuster. Andere Organe/ Gewebe wie die Skelettmuskulatur und die Leber sind TF-arm (Drake et al., 1993; Mackman, 2005). Unter physiologischen Bedingungen weisen weder die Endothelzellen noch die Zellen der *Tunica intima* vom Blutgefäß eine signifikante TF-Expression auf (Wilcox et al., 1989; Drake et al., 1993). Starke TF-Expressionslevel findet man jedoch in der Adventitia der Blutgefäße (Wilcox et al., 1989).

Gerinnungsphysiologen waren lange der Überzeugung, dass TF unter normalen Bedingungen nicht von zirkulierenden Blutzellen exprimiert wird. Diese Vorstellung

unterstützte die „Enveloptheorie“. Giesen et al. veränderten dieses Konzept, da sie bei gesunden Patienten im Blut zirkulierenden TF nachwiesen (Giesen et al., 1999). Der Herkunftsort des im Blut zirkulierenden TF-Proteins ist bisher nicht im Detail geklärt.

Unter *in vitro*-Bedingungen wurde gezeigt, dass Monozyten, Plättchen und Granulozyten nach Stimulation TF exprimieren was mit einer erhöhten TF-Prokoagulabilität assoziiert war. Ferner wurde bei unterschiedlichen Erkrankungen wie bei der koronarer Herzerkrankung, dem Myokardinfarkt, der Sepsis und der Sichelzellanämie ein erhöhter TF-Plasmaspiegel gemessen. Weiterhin wird angenommen, dass eine so genannte TF-„Enkryption“ die posttranslationale Suppression der TF-Aktivität auf der Zelloberfläche verursacht. Trotz intensiver Untersuchungen ist es bisher umstritten, ob TF von Plättchen exprimiert wird. Bislang wurde beschrieben, dass Plättchen TF in den α -Granula und dem offenen Kanalikularsystem speichern (Zillmann et al., 2001; Muller et al., 2003). Weiterhin zeigten Rauch et al., dass Plättchen TF von Zytokin-stimulierten Leukozyten aufnehmen können (Rauch et al., 2000). Kürzlich veröffentlichte die Arbeitsgruppe von Weyrich Ergebnisse, die verdeutlichten, dass ruhende Plättchen TF-prä-mRNA besitzen, welche bei Aktivierung der Thrombozyten zur reifen TF-mRNA und dann zu thrombogenem TF-Protein prozessiert wurde (Schwertz et al., 2006).

Giesen et al. gelang es nachzuweisen, dass TF als Bestandteil von Mikropartikeln (MP) im Blut zirkuliert (Giesen et al., 1999). MP sind Lipoproteinreiche Strukturen mit einem Durchmesser kleiner als 1,5 μm . Sie entstehen aus Membranabschnürungen von ruhenden, aktivierten oder apoptotischen Zellen. MP sind reich an Phosphatidylserin und begünstigen dadurch die TF-vermittelte Gerinnung, die solche Phospholipidoberflächen benötigt. Berkmans et al. bestätigten, dass TF-positive MP die Thrombingeneration beeinflussen (Berckmans et al., 2001). Experimentelle Studien zeigten, dass inflammatorische Zytokine wie TNF- α die TF-Expression in kardiovaskulären Zellen induzierten und die Abschnürung von TF-positiven MP von Leukozyten, Endothel- und glatten Muskelzellen bedingten (Rauch et al., 2000; Wu und Aird, 2005; Szotowski et al., 2005a; Goldin-Lang et al., 2007). Bei verschiedenen pathologischen Zuständen, dazu gehören der ischämischen Schlaganfall (Simak et al., 2006), das Anti-Phospholipid Antikörper Syndrom (Combes et al., 1999), Tumorerkrankungen

(Rauch und Antoniak, 2007) und die Sichelzellanämie (Shet et al., 2003), wurden erhöhte Spiegel zirkulierender TF-positiver MP nachgewiesen.

Neben der membranständigen Form ist TF auch als lösliche asTF-Isoform im Blut vorhanden (Bogdanov et al., 2003; Bogdanov et al., 2006). AsTF zeigt *in vitro* in Anwesenheit von Phospholipiden prokoagulatorische Eigenschaften (Szotowski et al., 2005a). Jedoch wird angenommen, dass asTF *in vivo* nur geringe prokoagulative Aktivität besitzt und möglicherweise auch als ein Inhibitor der Koagulationskaskade, durch Abfangen von FVIIa wirken kann (Butenas et al., 2005; Censarek et al., 2007).

1.7 Die Bedeutung der Tissue Factor-Expression im Herzen

Neben seiner Bedeutung für das extrinsische Gerinnungssystem wird TF konstitutiv und in hohem Maß im gesunden Herzen exprimiert. Gegenüber Skelettmuskeln enthält der kardiale Muskel große Mengen an TF ($15,8 \pm 8,8$ ng vs. $1,3 \pm 0,8$ ng TF/mg Protein; Herz- vs. Skelettmuskel (Luther et al., 2000)). Das Myokard weist eine 17,5-fach höhere TF-Aktivität als Skelettmuskelgewebe auf (Drake et al., 1989). Während der Embryonalentwicklung der Maus (ab Tag 9,5) und des Menschen (Stadium 12) kann eine TF-Expression auf mRNA-Ebene im sich bildenden Herzen nachgewiesen werden. Dabei ist die TF-Expression im fetalen Herzen bedeutend größer als im ausgereiften Herzen (Luther et al., 1996). Anhand der Beobachtungen wurde postuliert, dass die TF-Expression im Kardiomyozyt als morphogener Faktor im sich entwickelnden Herzen dienen könnte (Luther und Mackman, 2001).

Im Myokard des Menschen findet sich das TF-Protein vor allem im transversalen Anteil der Z-Bänder und der Glanzstreifen. Im Kardiomyozyten ko-lokalisiert TF mit zytoskelettalen Adhäsionsproteinen wie Desmin und Vinculin. Diese Proteine haben eine Bedeutung für die strukturelle Integrität des Myokards (Luther et al., 2000). Innerhalb des Herzens zeigt sich ein komplexes TF-Expressionsmuster. Im linksventrikulären Myokard ist der TF-Proteingehalt des Herzmuskels am höchsten und im rechten Vorhof am niedrigsten (Luther et al., 2000). Der myokardiale TF-Proteingehalt korreliert mit der Anzahl der Kardiomyozytenkontaktseiten im linksventrikulären Myokard und scheint für die myokardiale Integrität bedeutsam zu sein (Luther et al., 2000).

Es wurde beobachtet, dass es nach der Komplexbildung von TF mit FVII/FVIIa zu einer Interaktion der zytoplasmatischen Domäne von TF mit Filamin-A (ABP-280)

Einleitung

kommt. Über ABP-280 ist TF bei der Assemblierung der Aktinfilamente im Zytoskelett beteiligt. Die TF-ABP-280-Interaktion verursacht eine Phosphorylierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) und verschiedener Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) und beeinflusst hierdurch die Adhäsion, Migration und Kontraktionsfähigkeit von Zellen *in vitro* (Ott et al., 1998). Man nimmt an, dass TF über seine Interaktion mit ABP-280 einen funktionellen Anteil an der *Fasciae adhaerentes* hat.

Eine komplette Entfernung des TF-Gens in Mäusen mit 129/Sv genetischen Hintergrund führt zu einer embryonalen Letalität dieser Tiere (ab Tag 10,5), welche neben Blutungen auch Fehlentwicklungen aufweisen. Bei Inzucht auf hybridem genetischen Hintergrund (129/Sv x C57BL/6) überleben jedoch ca. 14% der Tiere (Carmeliet et al., 1996; Toomey et al., 1997; Carmeliet et al., 1997). Um die Bedeutung der TF-Expression für die myokardiale Funktion zu untersuchen, wurde durch ein Minigen (mit humanem TF) (muriner TF^{-/-}/humaner TF⁺, C57BL/6J Background) die TF-Genexpression auf etwa 1% der Norm reduziert (Parry et al., 1998; Pawlinski et al., 2002). Die reduzierte TF-Expression im Myokard dieser Tiere (LowTF Mäuse) ist mit einer ausgeprägten Myokardfibrose, Einblutungen, Hämosiderinablagerungen, einer linksventrikulären Pumpfunktionseinschränkung und verkürzten Lebensspanne assoziiert. Die kardiale Fibrose entwickelte sich initial in subepikardialen und perivaskulären Regionen und breitete sich im Laufe der Zeit über das gesamte Myokard aus. Die voranschreitende myokardiale Fibrose der LowTF Mäuse resultierte in einer verminderten Herzkontraktilität und einer signifikant reduzierten linksventrikulären Funktion (Pawlinski et al., 2002). Die beobachteten kardialen Auswirkungen können durch eine selektive Überexpression von TF im Kardiomyozyten gemindert werden (Pawlinski et al., 2007). Kürzlich wurde von der Gruppe um Mackman an Mäusen (TF^{floxed/floxed}/αMHC-Cre), die einen kardiomyozytären TF *knock out* aufweisen, gezeigt, dass 70% der TF-Expression im Herzen vom Myozyten stammt. Der verbleibende Teil der TF-Expression wird auf die kardialen Fibroblasten zurückgeführt (Pawlinski et al., 2007). Die Mäuse zeigten unter normalen Bedingungen eine nur schwach ausgeprägte myokardiale Fibrose, die unter pathologischen Umständen jedoch stark zunahm (Pawlinski et al., 2007). Bisher wurde nicht abschließend geklärt, ob die beobachtete myokardiale Fibrose durch eine veränderte Hämostase im Myokard oder durch die nicht-hämostatischen Eigenschaften von TF vermittelt wird (Davis und Erlich, 2008).

1.8 Die Inflammatorische Kardiomyopathie und das Thromboserisiko

Enteroviren aus der Familie der Picornaviridae, besonders Coxsackieviren der Gruppe B (CVB), sind dafür bekannt, dass sie eine virale Myokarditis (MC) beim Menschen verursachen (Pauschinger et al., 1999; Kuhl et al., 2005). CVB3 gehört zu den lytischen Viren, kann jedoch der Immunantwort des Wirts umgehen und im Myokard persistieren (Klingel et al., 1992). Hierbei können Immunzellen als nicht kardiales Virusreservoir dienen (Klingel et al., 1996). Untersuchungen an Mausmodellen zeigten, dass eine CVB3-Infektion eine akute MC verursacht, die durch Myozytolyse und intestinaler Immunzellinfiltration gekennzeichnet ist. Wie in Abbildung 5 gezeigt, kann sich aus einer MC eine DCM mit konsekutiver Herzinsuffizienz entwickeln (Liu und Mason, 2001).

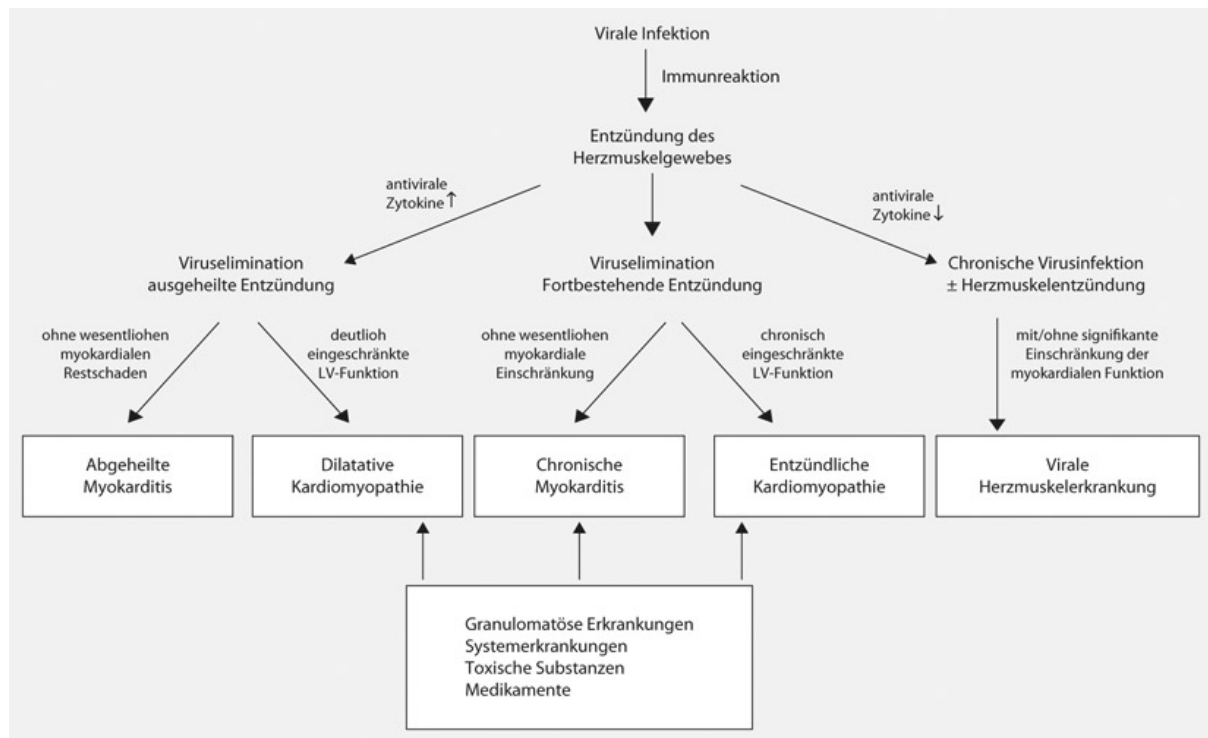


Abbildung 5. Biopsiebasierte diagnostische Einteilung der entzündlichen Kardiomyopathien als Grundlage der spezifischen Therapieoptionen (Schultheiss und Kuhl, 2008).

Die Entwicklung der DCM aus einer MC verläuft dreiphasig (Abbildung 6). Während der ersten Phase kommt es zur myokardialen Schädigung, die meist durch eine virale Infektion, vermutlich durch die genetische Prädisposition des Patienten bedingt wird (Grunig et al., 1998). Diese Phase verläuft meist symptomfrei und wird nicht diagnostiziert. In der nachfolgenden zweiten Phase kommt es zur

Einleitung

autoimmunen Reaktion auf kardiale Antigene, die durch die Initialverletzung getriggert wird (Caforio et al., 2002). Diese Reaktion verläuft mit den klinischen Symptomen einer Herzinsuffizienz und fulminanten myokardialen Schädigung ab, die einer medikamentösen Behandlung bedarf (Latham et al., 1989; Mason et al., 1995). In der dritten und letzten Phase bilden sich die Merkmale der DCM, wie eine ventrikuläre Dilatation mit Funktionsstörungen und – in einigen Fällen – ein Rechtsherzversagen, aus (Towbin und Bowles, 2002). Eine myokardiale Viruspersistenz kann eine chronische Entzündung mit ventrikulärer Dilatation und Herzinsuffizienz zur Folge haben (Wessely et al., 1998; Lenzo et al., 2002). Die einzelnen immunhistologischen Stadien der MC werden anhand der „Dallas-Kriterien“ eingeteilt (Aretz, 1986). Nach heutigem Kenntnisstand wird die inflammatorische DCM als MC mit kardialer Dysfunktion definiert (Richardson et al., 1996). Durchschnittlich entwickeln 30% der DCM-Patienten eine Herzinsuffizienz. In der Bundesrepublik Deutschland liegt derzeit die Prävalenz der Herzinsuffizienz bei ca. 1,5 Millionen Patienten. Folglich ist davon auszugehen, dass mindestens 500.000 Patienten an einer DCM leiden. Die DCM ist eine Herzmuskelerkrankung des jüngeren Menschen mit Häufigkeitsgipfeln der Manifestation in der 3. bis 5. Lebensdekade.

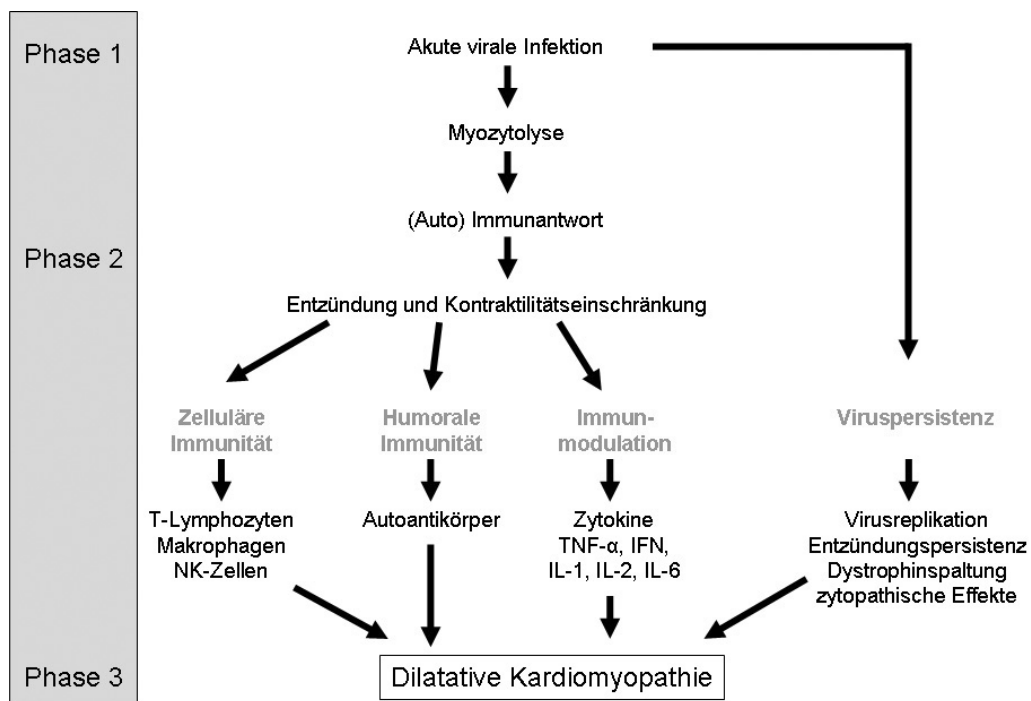


Abbildung 6. Pathogenetisches Konzept der postmyokarditischen dilatativen Kardiomyopathie (DCM). Es sind die drei Phasen abgebildet, die zur Ausbildung einer DCM führen (IFN: Interferon; IL: Interleukin; NK-Zellen: natürliche Killerzellen; TNF: Tumornekrosefaktor).

Die Bedeutung der DCM wird allein daran deutlich, dass diese Erkrankung neben der koronaren Herzkrankheit die Hauptindikation für eine Herztransplantation darstellt (Matoba et al., 2004). Komplikationen können sowohl während der frühen als auch der späten Phase der myokardialen Infektion auftreten (Woodruff, 1980; Kishimoto et al., 1984; Liu und Mason, 2001). Reizleitungsstörungen im Herzen, Arrhythmien, Kardiomegalie, Herzinsuffizienz und Thromboembolien sind als auftretende Komplikationen gut beschrieben. Die medikamentöse Therapie der DCM sollte unabhängig von den Inflammationswerten und der Viruslast den Richtlinien zur Behandlung der Herzinsuffizienz folgen (ACE-Hemmer, AT₁-Antagonisten, β -Blocker, Spironolacton, Diuretika und gegebenenfalls Digitalis). Als weitere Therapiemöglichkeiten dient die Immunsuppression der myokardialen Entzündung durch β -Interferon oder die Immunadsorption zur Eliminierung der kardiodepressiven Autoantikörper (Kuhl und Schultheiss, 1995; Felix et al., 2000; Wojnicz et al., 2001). Trotz neuerer Therapiemaßnahmen bezüglich der Herzinsuffizienz und DCM liegt die 5-Jahres-Mortalität noch immer über 50%. Ferner wurde beobachtet, dass die Entwicklung einer Herzinsuffizienz das Thromboserisiko erhöht (Tomioka et al., 1985). Eine akute MC als Todesursache konnte in bis zu 5,6% der untersuchten Autopsiefälle belegt werden (Carniel et al., 2004).

In klinischen Fallbeschreibungen von akuten MC wurde ein erhöhtes Auftreten von ventrikulären Fibrinablagerungen mit Thrombusbildung beobachtet (Daly et al., 1983; Kojima et al., 1988; Mazza et al., 1998; Weikert et al., 2002; Miyamoto et al., 2005; Kuh und Seo, 2005). Die betroffenen Patienten benötigten dringend eine anti-koagulative Behandlung. Bislang sind die genauen pathologischen Mechanismen der thrombotischen Komplikationen wie intrakardiale Thrombenentstehung und Thromboembolien im Menschen nicht geklärt. Die Thrombenentstehung in den Ventrikeln während der myokardialen Entzündung können anhand der Virchow-Trias (Endothelalterationen, Veränderungen der Strömungsgeschwindigkeit des Blutes im Herzen und Veränderung der Blutbeschaffenheit/ Aktivierung der Koagulationskaskade) erklärt werden. Bei DCM-Patienten wurden ebenfalls Thromben in den vergrößerten Herzkammern beschrieben. Jene Patienten wiesen auch eine erhöhte *in vivo*-Plättchenaktivierung auf (Gottdiener et al., 1983; Weikert et al., 2002). Als Ursache für die erhöhte Thrombose-Inzidenz bei den MC- oder DCM-Patienten wurden deshalb zum einen die rheologischen Veränderungen des Blutflusses wie Stasis in den dilatierten Ventrikeln und zum anderen die akuten Entzündungs-

prozesse zusammen mit signifikanter Veränderung der Gerinnung im Herzen diskutiert (Kojima et al., 1988). Diese Hypothese stimmt mit den Ergebnissen von verschiedenen Maus-MC-Modellen überein, in denen eine schwerwiegende Thrombosen innerhalb der Ventrikel und Vorhöfe dokumentiert wurde (Tomioka et al., 1985; Tomioka et al., 1986; Kishimoto et al., 1992).

In der deskriptiven Studie von Nakamura et al. wurde eine verstärkte TF-Proteinexpression bei gleichzeitig unveränderter TFPI-Expression im Endokard von Patienten mit myokardialer Entzündung beobachtet. Die Autoren erklärten diese Befunde mit einer Immunzell-assoziierten Induktion der TF-Expression im Myokard und einem dadurch resultierenden Anstieges des thrombotischen Risikos (Nakamura et al., 2003). Es ist jedoch unklar, ob inflammatorische Zytokine direkt die TF-Expression in Kardiomyozyten induzieren und diese Expressionserhöhung das Thromboserisiko steigern.

2 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit werden nachstehende Ziele verfolgt:

- Es soll an einem Tiermodell die Frage beantwortet werden, inwiefern eine CVB3-induzierte inflammatorische Kardiomyopathie (CM) im zeitlichen Verlauf die myokardiale TF-Expression *in vivo* verändert und hierdurch die lokale und systemische Thrombogenität des Herzens und Blutes beeinflusst.
- Anhand von Myokardbiopsien, die Patienten mit vermuteter akuter MC/inflammatorischer CM entnommen wurden, soll festgestellt werden, ob sich eine veränderte TF-Expression im Herzen beobachten lässt und ob diese mit krankheits-relevanten Markern assoziiert ist.
- Mit Hilfe von Zellkulturexperimenten soll an einer etablierten Kardiomyozytenzelllinie die transkriptionelle Regulation der basalen und Zytokin-induzierten TF-Genexpression untersucht werden. Ferner wird geprüft, ob TNF- α die zelluläre Thrombogenität von Kardiomyozyten beeinflusst und ob Kardiomyozyten durch Freisetzung von Mikropartikeln die Thrombogenität der Umgebung *in vitro* erhöhen.
- Außerdem soll überprüft werden, ob die kardiomyozytäre TF-Expression neben seiner Bedeutung für die kardiale Hämostase auch eine Rolle für die Vitalität der Kardiomyozyten unter inflammatorischen Bedingungen *in vitro* besitzt.

3 Material

3.1 Chemikalien und Substanzen

Es wurden Chemikalien des höchsten Reinheitsgrades verwendet.

Acrylamid	Bio-Rad Laboratories (München, D)
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories (München, D)
Ampizillin	Sigma-Aldrich (München, D)
Biozym LE Agarose	Biozym (Hessisch Oldendorf, D)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (München, D)
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	AnaSpec (San Jose, CA, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (München, D)
Dithiothreitol (DTT)	Calbiochem (Darmstadt, D)
dNTP Mix	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D)
Dual Color Protein Standard IV	PeqLab (Erlangen, D)
Ethidiumbromid	Bio-Rad Laboratories (München, D)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich (München, D)
Glyzerin	Sigma-Aldrich (München, D)
Humaner Factor VIIa (biotinyliert)	American Diagnostica GmbH (Pfungstadt, D)
Humaner Faktor X	American Diagnostica GmbH (Pfungstadt, D)
Humaner rekombinanter Tissue Factor (lipidiert)	American Diagnostica GmbH (Pfungstadt, D)
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich (München, D)
Kanamyzin	Sigma-Aldrich (München, D)
L- α -Phosphatidylcholin (PC)	Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA)
L- α -Phosphatidylserin (PS)	Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA)
LB Agar	Sigma-Aldrich (München, D)
LB Broth	Sigma-Aldrich (München, D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich (München, D)

Material

Natriumdesoxycolat	Sigma-Aldrich (München, D)
N,N-Bis (2-hydroxyethyl)-glycin (Bicin)	Sigma-Aldrich (München, D)
N,N'-(1,2-Dihydroxyethylen)-bisacrylamid	Bio-Rad Laboratories (München, D)
n-Octyl- β -D-Glycopyranosid	Calbiochem (Darmstadt, D)
NovoSeven® (Rekombinanter FVIIa)	NovoNordisk (Kopenhagen, DK)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich (München, D)
2'-Amino-3'-methoxyflavone (PD98056)	Calbiochem (Darmstadt, D)
Phalloidin-MFP547	MoBiTec (Göttingen, D)
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich (München, D)
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1	Sigma-Aldrich (München, D)
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich (München, D)
Ready-Load 100 bp DNA ladder	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Ready-Load 1 Kb DNA ladder	Invitrogen (Karlsruhe, D)
SeaKem LE Agarose	BioWhittaker Molecular Application (Rockland, ME, USA)
4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinyl-phenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole (SB203580)	Calbiochem (Darmstadt, D)
Anthra[1,9- <i>cd</i>]pyrazol-6(2 <i>H</i>)-one1,9-pyrazoloanthrone (SP600125)	Calbiochem (Darmstadt, D)
Spectrozyme® FXa	American Diagnostica GmbH (Pfungstadt, D)
Streptavidin (fluoreszenzmarkiert)	MoBiTec (Göttingen, D)
SYBR® Green I	Invitrogen (Karlsruhe, D)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D)
TissueTek	Sigma-Aldrich (München, D)
Muriner Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α)	PreproTec (Umkirch, D)
TO-PRO 3	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Triciribine	Calbiochem (Darmstadt, D)
Wasser	Promega (Mannheim, D)
Xylol	Carl Roth (Karlsruhe; D)

Material

(*R*)-(+)-*trans*-4-(1-Aminoethyl)-N-(4-Pyridil)cyclohexanecarboxamide dihydrochloride monohydrate (Y-27632)

Calbiochem (Darmstadt, D)

3.2 Kits

Apoptose Assay (Annexin V – FITC)

MoBiTec (Göttingen, D)

BCA Protein Assay Kit

Pierce Chemical Company
(Rockford, IL, USA)

CFSE Cell trace Kit

Invitrogen (Karlsruhe, D)

ChargeSwitch® Total RNA Cell Kit

Invitrogen (Karlsruhe, D)

ECL plus Detection Kit

GE Healthcare Bioscience
(Little Chalfont, UK)

High Capacity Archive Kit

Applied Biosystems (Darmstadt, D)

Mycoplasma Detection Kit 1296744

Roche Applied Science (Mannheim, D)

NucleoSpin® RNA II

Macherey Nagel (Düren, D)

Omniscript cDNA

Qiagen (Hilden, D)

peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I

PEQLAB Biotechnologie (Erlangen, D)

peqGOLD Plasmid Midi Kit (Endofree)

PEQLAB Biotechnologie (Erlangen, D)

QCL-1000® Chromogenic Endpoint LAL Kit

BioWhittaker Molecular Application
(Rockland, ME, USA)

TaqMan Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG

Applied Biosystems (Darmstadt, D)

T-Rex™ System

Invitrogen (Karlsruhe, D)

3.3 Medien und Zusätze

Bakterien

Bakterien wurden in Suspension mit LB Medium (LB Broth, Sigma-Aldrich) kultiviert. Zum Vereinzeln von Bakterienkolonien auf Agarplatten wurden mit LB Agar Mix hergestellte Agarplatten verwendet.

Material

Zellkultur

Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich (München, D)
Blastizidin S	Calbiochem (Darmstadt, D)
Claycomb-Medium	Sigma-Aldrich (München, D)
DMEM	PAA Laboratories (Pasching, A)
Fetales Kälberserum (FBS-Gold)	PAA Laboratories (Pasching, A)
Fetales Kälberserum (Tetrazyklin-frei)	PAA Laboratories (Pasching, A)
Fibronektin	TEBU Bio (Offenbach, D)
Gelatine	Sigma-Aldrich (München, D)
G-418 (Geneticin®)	PAA Laboratories (Pasching, A)
L-Glutamin	PAA Laboratories (Pasching, A)
Norepinephrine	Sigma-Aldrich (München, D)
Penizillin/Streptomycin	PAA Laboratories (Pasching, A)
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	PAA Laboratories (Pasching, A)
Trypanblau	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories (Pasching, A)
Zeozin™	Invitrogen (Karlsruhe, D)

Murine Kardiomyozyten (HL-1)

Claycomb-Medium, 10% (v/v) FBS Gold, 2 mM L-Glutamine; 100 U/mL Penizillin; 100 µg/mL Streptomycin; 0,03 mM Ascorbinsäure; 10 µM Norepinephrine

Murine mikrovaskuläre Endothelzellen aus dem Herzen (HMEC-5)

DMEM, 10% (v/v) FBS Gold, 2mM L-Glutamine; 100 U/mL Penizillin; 100 µg/mL Streptomycin

Nierengewebszellen von Grünen Meerkatzen (COS-7)

DMEM; 10% (v/v) FBS Gold, 2 mM L-Glutamine; 100 U/mL Penizillin; 100 µg/mL Streptomycin

3.4 Lösungen

30% (w/v) Acryl-Bisacrylamid Lösung

29% (w/v) Acrylamid, 1% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid

Puffer für die TF-Aktivitätsmessung

10 mM HEPES, 5 mM CaCl₂, 0,1% (w/v) BSA, pH 7,5

EDTA-Puffer

50 mM Bicin, 100 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,1% (w/v) BSA, pH 8,5

1x PBS

115 mM NaCl, 27 mM KCl, 16 mM Na₂HPO₄, 4 mM KH₂PO₄, pH 7,4

RIPA-Puffer

50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Igepal CA-630, 0,5% Na-Desoxycholat, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,0

1x SDS PAGE Laufpuffer

192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1% (w/v) SDS

50x TAE-(Tris-Acetat-EDTA)-Puffer

40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0

10x TBS-(Tris-Borat-Natrium)-Puffer

100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5

10x TBS-T-(Tris-Borat-Natrium-Tween20)-Puffer

100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Tween 20, pH 7,5

3.5 Enzyme

Gentherm DNA-Polymerase

Rapidozym (Berlin, D)

Pfu DNA-Polymerase

Rapidozym (Berlin, D)

RNAse (DNase-frei)

Sigma-Aldrich (München, D)

*Eco*RI

Roche Applied Science (Mannheim, D)

*Hind*III

Roche Applied Science (Mannheim, D)

*Xho*I

Roche Applied Science (Mannheim, D)

3.6 Vektoren

pCR4-TOPO	Invitrogen (Karlsruhe, D)
pcDNA3.1 (-)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
pENTR/H1/TO	Invitrogen (Karlsruhe, D)
pcDNA6/TR	Invitrogen (Karlsruhe, D)
pEGFP-N1	BD Bioscience (Heidelberg, D)

3.7 Zellen

COS-7	LGC Promochem (Wesel, D) Prof. Dr. W. C. Claycomb (Louisiana State University Medical Center, New Orleans, Louisiana, USA)
HL-1	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, D)
MHEC-5	Invitrogen (Karlsruhe, D)
TOP 10 (<i>E. coli</i>)	Invitrogen (Karlsruhe, D)

3.8 Tierstämme

ABY/SnJ (H-2 ^b)	Charles River Laboratories Inc. (Sulzfeld, D)
NMRI Auszuchtmäuse	Charles River Laboratories Inc. (Sulzfeld, D)

3.9 Antikörper

Primärantikörper

Monoklonale Antikörper

Anti-Maus CD3 (CD3-12)	Serotec (Düsseldorf, D)
Anti-Desmin (D33)	DakoCytomation (Hamburg, D)
Anti-Fibrin (E8)	Immunotech (Marseilles, F)
Anti-Humanes α -Kardiales Aktin (alpha-Sr-1)	DakoCytomation (Hamburg, D)
Anti-Ki67	BD Bioscience (Heidelberg, D)
Anti-Maus MAC3 (M3/84)	BD Bioscience (Heidelberg, D)
Anti-RhoA (26C4)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)

Material

Anti-Humanes Sarkomeres Myosin (MF-20)	Developmental Studies Hybridoma Bank, (Iowa City, Iowa, USA)
Anti-Maus VCAM-1	BD Bioscience (Heidelberg, D)

Polyklonale Antikörper

Anti-aktive Caspase 3	BD Bioscience (Heidelberg, D)
Anti-Maus TF	American Diagnostica GmbH (Pfungstadt, D)
Anti-Maus TF (C-Term)	Pineda Antikörper-Service (Berlin, D)
Anti-Maus TF (FL-294)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
Anti-Maus TF	Prof. Dr. Y. Nemerson (Mount Sinai School of Medicine, New York City, NY, USA)
Anti-Maus TFPI	American Diagnostica GmbH (Pfungstadt, D)
Anti-Humaner TF (psTF)	Prof. Dr. Y. Nemerson (Mount Sinai School of Medicine, New York City, NY, USA)

Sekundärantikörper

Ziege Anti-Kaninchen IgG HRP-konjugiert (Klon DAK-GO1, IgG1)	DakoCytomation (Glostrup, DK)
Kaninchen Anti-Maus IgG HRP-konjugiert (Klon DAK-RA1, IgG1)	DakoCytomation (Glostrup, DK)
Ziege Anti-Maus IgG MFP488-konjugiert (H+L)	MoBiTec (Göttingen, D)
Ziege Anti-Kaninchen IgG MFP488-konjugiert (H+L)	MoBiTec (Göttingen, D)
Ziege Anti-Maus IgG MFP555-konjugiert (H+L)	MoBiTec (Göttingen, D)
Ziege Anti-Kaninchen IgG MFP555-konjugiert (H+L)	MoBiTec (Göttingen, D)

3.10 Primer und Bedingungen für die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Alle Primer und Sonden wurden von der Firma TIB-Molbiol GmbH (Berlin, D) oder Invitrogen (Karlsruhe, D) synthetisiert. Mit Hilfe der BLAST-Software (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) wurden sie auf die Amplifikation von unerwünschten Fragmenten hin überprüft.

In den nachfolgenden Tabellen sind die entsprechenden sequenzspezifischen Primerpaare und zusätzlich, die für die quantitative Real-time PCR (TaqMan®) benötigte Sondensequenz aufgeführt. Alle Sonden waren mit 5'-FAM als Farbstoff und 3'-TAMRA als Unterdrückfarbstoff (*Quencher*) markiert.

Ferner sind die Primerpaare für die qualitative PCR und die verwendeten Klonierungsprimer, sowie shRNA-Sequenzoligonukleotide aufgelistet. Alle Primer bzw. Oligonukleotide sind in 5' – 3' Orientierung angegeben.

Tabelle 1. TaqMan® Assays für murines Herzgewebe

Zielgen	ABI Nummer
18S rRNA	Hs99999901_s1
AKT-1	Mm00437443_m1
AKT-2	Mm00545827_m1
IL-1 β	Mm00434228_m1
TNF- α	Mm00443258_m1
TF	Mm00438853_m1

Tabelle 2. Oligonukleotide zur Quantifizierung von murinen Genen mittels SYBR® Green I TaqMan® PCR

Zielgen	Vorwärts	Rückwärts
TF (real)	GGAAAGGCTCAAGCACAGGAAA	CAGGAAACTCTTCCATTGCTCT GTG
GAPDH (real)	CCTGCACCACCAACTGCTTA	TCATGAGCCCTTCCACAATG
TFPI (real)	AGTGTAAGAAAACATGCATACCA GGTT	CTCGGCAGAGTCCAGGGT

Material

Tabelle 3. TaqMan® Assays für humanes Herzgewebe

Zielgen	ABI Nummer
AP-1	Hs00277190_s1
CD3d	Hs00174158_m1
CD62E	Hs00174057_m1
CYR61	Hs00155479_m1
HPRT-ABI	Hs99999909_m1
Kollagen I	Hs00164004_m1
Kollagen IV	Hs00266237_m1
MAPK8	Hs00177083_m1
MAPK14	Hs00176247_m1
TIMP4	Hs00162784_m1
uPA	Hs00170182_m1

Tabelle 4. Selbstdesignte TaqMan® Primer für humanes Herzgewebe

Zielgen	Vorwärts	Rückwärts	Sonde
TF	GCGGTTACGCA CTACAAAT	CCACAAATACCACA GCTCCA	TTCAAGCAGTGATTCC CTCCCGAACA

Tabelle 5. Oligonukleotide für die Nachweisreaktion (qualitative PCR) der untersuchten murinen Gene

Zielgen	Primername	Oligo-Sequenz	T _m in °C
FVIIa	mFVII-For1	CAGGCTGTGCTGAAAATCAA	66
	mFVII-Rev1	GACATGAGTTCCAGGGCTGT	70
PAR-1	mPAR1 F	CTCCTCAAGGAGCAGACCAC	72
	mPAR1 R	GCAGACGATGAAGATGCAGA	68
PAR-2	mPAR2-For	CACCACCTGTCACGATGTGCT	73
	mPAR2-Rev	CTCAGTAGGAGGTTTTAACAC	67

Material

Tabelle 6. Oligonukleotide für die Klonierung von murinen TF in Expressionsvektoren

Vektor	Primernamen	Oligo-Sequenz	T _m in °C
pcDNA3.1 (-)	For3-XhoI	TGGACCTCGAGACCCTTGGACATGGCG	55
	RevA-Hind3	CACGAAGCTTTCTATGCCAAGCGCGACG	55
eGFP-N1	mTFForA-XhoI-EGFP-N1	AGATCTCGAGCGCCACCATGGCGATCCTCGTGCG	55
	mTFrev-HindIII-EGFP-N1	ATTCGAAGCTTTGCCAAGCGCGACG	55

Tabelle 7. Oligonukleotide zur Generierung von shRNA gegen TF im pENTR/H1/TO-Vektor

shRNA	Oligo-Name	Oligo-Sequenz
530	shRNA_530_TOP	CACCGCAAGGACTTGGGTTATATAATTCAAGAGAT TATATAACCCAAGTCCTTGC
	shRNA_530_BOTTOM	AAAAGCAAGGACTTGGGTTATATAATCTCTTGA ATTATATAACCCAAGTCCTTGC
780	shRNA_780_TOP	CACCGCTCCTGGCCACCATCTTTATTTCAAGAG AATAAAGATGGTGGCCAGGAGC
	shRNA_780_BOTTOM	AAAAGCTCCTGGCCACCATCTTTATTCTCTTGAA ATAAAGATGGTGGCCAGGAGC

3.11 Geräte

ABI 7900 Sequence Detection System	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
BioDoc Analyze	Biometra (Göttingen, D)
BioPhotometer	Eppendorf AG (Wesseling-Berzdorf, D)
Centrifuge 5415R	Eppendorf AG (Wessling-Berzdorf, D)
CO ₂ -Inkubator C200	Labotect Labor-Technik-Göttingen GmbH (Göttingen, D)
Durchlichtmikroskop DMIL	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, D)
Durchflusszytometer FACScan™	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, D)
Fastblot B44	Biometra (Göttingen, D)
Fluoreszenzmikroskop Leica DM IRBE	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, D)
Minifuge GL	Heraeus Holding GmbH (Hanau, D)
Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Cell	Bio-Rad (München, D)

Material

Mini SUBCELL GT	Bio-Rad Laboratories (München, D)
Peltier Thermal Cycler PTC-200	MJ Research Inc. (South San Francisco, CA, USA)
PowerPac 1000	Bio-Rad Laboratories (München, D)
Ultraschall-Bad Bandelin Sonorex RK31	Bandelin electronic GmbH (Berlin, D)
Versamax Microplate Reader	Molecular Devices GmbH (Ismaning, D)

3.12 Sonstige Materialien

Hybond-P PVDF-Membran	GE Healthcare Bioscience (Little Chalfont, UK)
Hyperfilm ECL	GE Healthcare Bioscience (Little Chalfont, UK)
Sterilfilter 0,22 µm	Schleicher & Schüll (Nürnberg, D)

4 Methoden

4.1 Tiermodell einer CVB3-Myokarditis

Verwendeter Tierstamm

Der gesamte Tierversuch wurde mit Mäusen des ABY/SnJ (H-2^b) Stammes von Charles River Laboratories Inc. (Sulzfeld, Germany) durchgeführt. Die Tiere wurden bei einem 12 h Tag-Nacht-Zyklus und kontrollierter Temperatur ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) gehalten und gezüchtet. Die Haltung und Versuchsdurchführung erfolgte in den Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin (FEM - Charité – Universitätsmedizin Berlin). Während des Tierversuchs wurden die Vorschriften des geltenden deutschen Tierschutzgesetzes beachtet.

Kardiotroper Virusstamm

Zur Infektion kam das bekannte kardiotrope Virus Coxsackievirus B3 (CVB3) Typ Nancy zum Einsatz. Der Virus wurde von Dr. Karin Klingel (Eberhard-Karls Universität, Tübingen, D) für den gesamten Tierversuch zur Verfügung gestellt. Vermehrung und Aufreinigung erfolgte wie bei Kandolf et al. beschrieben durch Dr. Karin Klingel (Kandolf und Hofschneider, 1985).

Ablauf des Tierversuchs

Mäuse im Alter von sechs bis sieben Wochen wurden intraperitoneal (i.p.) mit 5×10^4 plaque-forming units (pfu) von aufgereinigtem CVB3 infiziert. Die Analyse der Mäuse erfolgte, wie in Abbildung 7 gezeigt, zu drei verschiedenen Zeitpunkten (Tag 4, 8 and 28 *post infection* [p.i.]).

In jeder untersuchten Gruppe befanden sich 8-12 Mäuse. Die uninfizierten Kontrollen unterschieden sich hinsichtlich der untersuchten Parameter nicht und wurden deshalb zusammengefasst.

Die Wahl der Untersuchungszeitpunkte erfolgte mit dem Ziel, dass die drei bekannten Phasen der viralen MC untersucht werden konnten: frühe (Tag 4 p.i.), akute (Tag 8 p.i.) und die chronische Phase (Tag 28 p.i.) (Szalay et al., 2006).

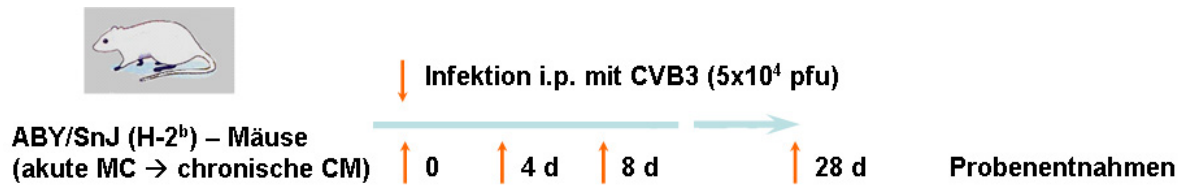


Abbildung 7. Zeitachse des Tierversuchs mit dem Mausmodell einer akuten Myokarditis (MC) und chronischen Kardiomyopathie (CM).

In vivo-Messung der Herz-Funktionsparameter

An den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten wurden die unterschiedlichen Herz-funktionsparameter unter Einsatz eines Konduktanzkatheters erhoben. Die Durchführung der Messung erfolgte durch die Arbeitsgruppe Tschöpe im CharitéCentrum 11 am Campus Benjamin Franklin (Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, D).

Nach der Betäubung (Thiopental; 125 mg/kg Körpergewicht, i.p.) wurden die Tiere intubiert und künstlich beatmet. Wie bei Westerman und Mitarbeiter beschrieben, wurde ein 1.4 F Mikrokonduktanzkatheter (ARIA SPR-719; Millar-Instruments, Houston, TX, USA) im linken Ventrikel (LV) positioniert und das Arbeitsdiagramm (kontinuierliche LV Druck-Volumen Parameter (DV)) aufgezeichnet (Westermann et al., 2006). Eine Kalibrierung erfolgte mit Volumen-Messwerten durch die Anwendung der *wash in*-Technik mit hypertonischer Salzlösung (10%) (Steendijk et al., 2001). Kardiale Funktionsparameter wurden anhand der DV-Daten sowohl unter Normalbedingungen als auch während einer transienten Reduktion der Blutzufuhr nach Verschließen der abdominalen *Vena cava* aufgenommen. Nach erfolgreichem Vermessen der Herzfunktion wurden die Herzen mit einer Natriumchlorid-Lösung (0,9%) perfundiert, entfernt und für spätere Untersuchungen bei (-80°C) gelagert.

4.2 Untersuchungen an humanen Endomyokardbiopsien

Patientenkollektiv und Probenentnahme

Endomyokardbiopsien (EMB) wurden von Patienten mit einer vermuteten MC oder inflammatorischen CM bei der Herzkatheteruntersuchung entnommen (CharitéCentrum 11, Campus Benjamin Franklin, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, D). Die Patienten, bei denen eine MC bzw. inflammatorischer CM (N=54) vermutet wurde, hatten eine bis zu sechs Wochen

zurückliegende virale Infektion, neu aufgetretene akute Beschwerden wie Dyspnoe, Palpitationen oder atypische *Angina pectoris*. Die als Kontrollen eingestuft Patienten (N=14) hatten lang anhaltende Beschwerden, die auf eine myokardiale Erkrankung hindeuten. Es konnte jedoch kein Nachweis einer myokardialen Entzündung und einer viralen Infektion des Herzens erbracht werden. Mittels koronarer Angiographie wurde das Bestehen einer koronaren Herzerkrankung bei allen Patienten ausgeschlossen. Das Vorhandensein einer Herzklappenerkrankung, Amyloidose und anderer Speicherkrankheiten galt ebenfalls als Ausschlusskriterium. Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) wurde ebenfalls während der Katheteruntersuchung bestimmt. Die untersuchten Gewebeproben stammten aus dem rechten ventrikulären Septum und wurden nach Entnahme sofort in flüssigen Stickstoff überführt und gelagert.

Alle Untersuchungen wurden von den gesetzlich vorgesehenen Einrichtungen überwacht und waren im ethischen Einklang mit der Deklaration von Helsinki aus dem Jahr 1975.

Probenentnahmeaufarbeitung

Der Nachweis von viralen Genome im Myokard erfolgte mittels einer *nested*-PCR an einer entnommenen EMB (Kuhl et al., 2003).

Der Nachweis der myokardialen Entzündungsreaktion erfolgte an einer separaten Biopsie. An dieser wurde die Expression zellulärer Adhäsionsmoleküle wie z.B. HLA-1, ICAM-1 und VCAM-1 mittels immunhistochemischer Färbungen von seriellen myokardialen Schnitten semiquantitativ analysiert. Des Weiteren wurden die Anzahl der eingewanderten CD3⁺-Zellen pro mm² Myokardfläche bestimmt. Die verwendete Methode ist im Detail bei Noutsias und Mitarbeitern (Noutsias et al., 1999) bzw. in Abschnitt 4.8 beschrieben.

Als positive myokardiale Entzündungsreaktion wurde definiert, wenn im Myokard der Patienten mehr als sieben CD3⁺-Zellen pro mm² nachweisbar waren. Bei grenzwertig erhöhten CD3⁺-Zellzahlen von 4-7 Zellen pro mm² mussten ferner, mindestens zwei zelluläre Adhäsionsmoleküle eine verstärkte Färbung in der Immunhistochemie der Myokardschnitte zeigen.

An einer weiteren Biopsie wurde die mRNA-Expression verschiedener Gene mittels der PreAmp TaqMan® Real-time PCR (siehe 4.7) analysiert.

4.3 Zellkulturexperimente

Im folgenden Abschnitt wird der Einfluss von TNF- α auf die TF-Expression und Thrombogenität von Kardiomyozyten analysiert. Die einzelnen Methoden sind detailliert in den Unterpunkten beschrieben. Die Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte 120 min nach Stimulation mittels quantitativer TaqMan® Real-time PCR. TF-Protein wurde per Western Blot bzw. durch Immunfluoreszenzmikroskopie detektiert. Die TF-Proteinaktivität wurde mit einem chromogenen Aktivitätsassay bestimmt.

Ferner wurde der Einfluss von verschiedenen intrazellulären Signalkaskaden auf die konstitutive und Zytokin-induzierte TF-Expression analysiert. Die Zellen wurden deshalb mit unterschiedlichen spezifischen Inhibitoren 60 min vor TNF- α Stimulation vorinkubiert. Die Analysen erfolgten sowohl auf mRNA-, Protein- als auch TF-Proteinaktivitätsebene.

4.3.1 Zellkultur von Zelllinien

Kultivierung und Passagieren von murinen Kardiomyozyten (HL-1)

HL-1 Zelllinie wurden aus tumorösen atrialen Kardiomyozyten von transgenen Mäusen etabliert und von Dr. W. C. Claycomb (Louisiana State University, Medical Center, New Orleans, Louisiana, USA) für die Versuche zur Verfügung gestellt (Claycomb et al., 1998).

Die Kultivierung der HL-1 Kardiomyozyten erfolgte in einem befeuchteten Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 98%. Alle verwendeten Kulturgefäße wurden mit einer Fibronectin-Gelatine-Lösung (5 mg/L Fibronectin, 0,02% (w/v) Gelatine) beschichtet. Ein Mediumwechsel erfolgte im Abstand von 2-3 Tagen mit Claycomb-Vollmedium. Der konfluente Monolayer zeigte im Phasenkontrastauflicht-Mikroskop das für HL-1 Zellen typische Erscheinungsbild polygonaler, pflastersteinartiger Zellen. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase blieben und nicht die stationäre Phase erreichten. Bei Konfluenz wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und durch Zugabe von Trypsin/ EDTA abgelöst. Nach Inhibierung der Trypsinaktivität wurden die Zellen in ein 15 mL-Röhrchen überführt und zentrifugiert (300 x g, 5 min). Das erhaltene Zellpellet wurde im Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die HL-1 Zellen wurden in der Dichte von 3×10^4 Zellen pro cm² Wachstumsfläche ausgesät.

Kultivierung von murinen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-5)

Die Kultivierung der Endothelzellen erfolgte analog zu den HL-1 Zellen. FBS-haltiges DMEM (10%) diente den Endothelzellen als Komplettmedium (Plendl et al., 1995).

Kultivierung von COS-7 Zellen

Die Kultivierung der COS-7 Zellen erfolgte wie vom Hersteller vorgeschlagen mit 10% FBS-haltigem DMEM als Komplettmedium unter oben genannten Bedingungen.

4.3.2 Isolation von primären neonatalen Kardiomyozyten der Maus

Drei bis vier Tage alte neonatale Mäuse wurden durch Dekaptierung getötet und das noch schlagende Herz aseptisch entnommen. Nach Entfernung der Vorhöfe wurde das überbleibende ventrikuläre Gewebe zerkleinert und bei 37°C unter Rühren in 15 mL steriler 0,08% Trypsin-Lösung verdaut. Nach 5 min wurden 10 mL vorsichtig abgenommen und verworfen, darin enthalten sind hauptsächlich Blutreste und Gewebetrümmer. Die entnommenen 10 mL wurden durch frische Trypsin-Lösung ersetzt und bei 37°C inkubiert. In 10 min Schritten wurden jeweils 10 mL der Lösung ausgetauscht. Der entnommene Überstand wurde in ein 15 mL Falconröhrchen überführt und die Aktivität des Trypsins mit 2 mL eiskaltem FBS gestoppt. Die vereinzelt Zellen wurden bei 500 x g pelletiert, in DMEM mit 50% FBS resuspendiert, später mit den anderen abgenommenen Überständen vereinigt und auf Eis gelagert. Die Prozedur wurde solange wiederholt, bis die zerkleinerten Mausherzfragmente vollständig verdaut waren. Nachdem alle Überstände vereinigt, gefiltert und pelletiert wurden, erfolgte die Resuspendierung des Zellgemischs in 10% FBS-haltigen DMEM. Im Anschluss konnte ein Aussäen der Zellen in ein geeignetes Zellkulturgefäß stattfinden. Nach Ablauf von einer Stunde unter normalen Zellkulturbedingungen wurde der Überstand vorsichtig entnommen, erneut pelletiert und die Zellen gezählt. Während der einstündigen Inkubation setzen sich kardiale Fibroblasten und Endothelzellen ab. Im Überstand befinden sich die gewünschten Kardiomyozyten. Die gezählten primären Kardiomyozyten wurden in einer Dichte von etwa 10^5 Zellen pro cm^2 in Kulturgefäße ausgesät und für weiterführende Versuche verwendet.

4.3.3 Einfrieren, Lagerung und Auftauen von Zellen

Zur Konservierung wurden die verwendeten Aliquots der Zelllinien in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in Zellkulturflaschen kultiviert, mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA abgelöst. Nach Zentrifugation (300 x g, 5 min) wurden die Zellen erneut mit 4°C kaltem PBS gewaschen und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in eiskaltem Kryokonservierungs-Medium (95% FBS, 5% DMSO) resuspendiert, die Zellsuspension in Kryoröhrchen aliquotiert und mit einem Einfriergerät („Mr. Frosty“, Nalgene Nunc) langsam (1°C/min) auf -80°C eingefroren. Anschließend wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert.

Zum Auftauen wurde das Einfriereröhrchen in 37°C warmen Wasser so lange geschwenkt bis keine Eiskristalle mehr sichtbar waren. Anschließend wurden sie in 10 mL PBS aufgenommen und sofort pelletiert (300 x g, 5 min). Die Zellen wurden in Zellkulturmedium resuspendiert und in die Zellkulturflaschen überführt.

4.3.4 Vitalitätstest und Kontaminationsanalyse

Vitalitätstest

Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte durch Versetzen von 50 µL Zellsuspension mit dem 4-fachen Volumen Trypanblau-Lösung (0,4%) und anschließender lichtmikroskopischer Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer. Als tote Zellen wurden blau gefärbte Zellen definiert, da lebende Zellen aufgrund ihrer intakten Membran den Farbstoff Trypanblau nicht aufnehmen.

Nachweis von Endotoxinen

Endotoxine induzieren die Expression von TF in einer Vielzahl von Zellen. Um auszuschließen, dass die in dieser Arbeit gemessene TF-Expression auf eine Induktion durch Endotoxine zurückzuführen war, wurde eine mögliche Endotoxinverunreinigung des Kulturmediums und der Zytokine mittels des Limulus-Amöbozyten-Lysat-Tests bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte mit dem QCL-1000® Test entsprechend dem Protokoll des Herstellers.

Nachweis von Mykoplasmen

Mykoplasmen beeinflussen die Expression von verschiedenen Proteinen und anderen Stoffwechselfvorgängen in den Zellen und führen so zu einer Verfälschung

von Versuchsergebnissen. Eine Kontamination der Zellen mit Mykoplasmen konnte per ELISA (Mycoplasma Detection Kit) ausgeschlossen werden. Der ELISA wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt.

4.3.5 Stimulation der Zellen

Für Stimulationsexperimente wurden die Zellen zunächst in einem geeigneten Zellkulturgefäß kultiviert. Bei Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und zwecks Serumentzug für mind. 24 h mit FBS- und Norepinephrine-freiem Claycomb-Medium inkubiert. Anschließend wurde das alte Basalmedium gegen frisches, den Stimulus enthaltendes serumfreies DMEM gewechselt und für die im Ergebnisteil angegebenen Zeiträume bei 37°C inkubiert. Bei den Inhibitorversuchen wurden die Zellen mit der jeweiligen inhibierenden Substanz für 60 min vorinkubiert.

Nach Ablauf der Inkubations-/ Stimulationszeit wurden die Zellen auf Eis gestellt, der Überstand abgenommen und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen bzw. die Zellkulturüberstände wurden sofort für die entsprechenden Versuche weiterverwendet oder bei -80°C gelagert.

4.4 Extraktion von RNA und Synthese von cDNA

4.4.1 RNA-Isolation aus Zellen und Gewebe

Zur RNA-Isolation wurde das NucleoSpin® RNA II von Macherey Nagel verwendet. Nach der Zellyse wurde die Probe zunächst in einer QIAShredder-Säule homogenisiert. Durch einen stark denaturierenden, guanidinisothiocyanathaltigen Puffer wurden RNAsen effizient inaktiviert, um eine Isolierung intakter RNA zu gewährleisten. Durch Zugabe von Ethanol wurden optimale Bedingungen hergestellt, sodass sich die Gesamt-RNA spezifisch an die Silicagel-Membran binden konnte, während übrige Substanzen wie DNA und Proteine effizient ausgewaschen wurden. Zum Schluss wurde die reine RNA mit 30 µL Nuklease-freiem Wasser von der Säule eluiert und entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -80°C eingefroren.

Zur Isolation der RNA aus Mausherzgewebe und humanen Myokardbiopsien kam TRIzol™, wie vom Hersteller verlangt, zum Einsatz.

Als weiterer Aufreinigungsschritt für die humanen Biopsien erfolgte die Verwendung des ChargeSwitch® Total RNA Cell Kit der Firma Invitrogen.

4.4.2 RNA-Quantifizierung und -Qualitätskontrolle

Mit Hilfe eines Photometers wurden die Konzentrationen der RNA bei 260 nm bestimmt. Bei der Messung entsprachen 40 µg RNA/mL einer optischen Dichte (OD) von 1. Zur Sicherstellung der Qualität der isolierten RNA wurde der Absorptionsquotient bestimmt. Das Verhältnis A_{260} zu A_{280} (Absorptionsmaximum von Proteinen) lässt auf die Reinheit der RNA schließen und sollte zwischen 1,5 und 2 liegen. Verunreinigungen mit Proteinen bzw. Salzurückständen, die dann beim Umschreiben in komplementäre DNA (cDNA) und bei TaqMan® Real-time PCRs zu möglichen Ungenauigkeiten führen können, werden durch einen kleineren Absorptionsquotienten angezeigt. In der vorliegenden Arbeit wurden nur Proben mit einem Zahlenwert größer als 1,6 verwendet.

4.4.3 Synthese der cDNA

Bei der cDNA-Synthese wird die instabile, Abbau-gefährdete mRNA in stabilere cDNA umgeschrieben.

Zum Auflösen möglicher Sekundärstrukturen der mRNA wurde diese 5 min bei 65°C denaturiert und sofort auf Eis gelagert. Die anschließende cDNA-Synthese (reverse Transkription) erfolgte gemäß Herstellerangaben mit dem Omniscript cDNA Synthesis Kit (Qiagen, Hilden, D), das die Avian-Myeloblastosis-Virus-Reverse Transkriptase verwendet. Als Nukleotide dienten Oligo(dT)-Primer, die im Bereich des Poly(A)-Schwanzes der eukaryotischen mRNA hybridisieren, sodass selektiv nur alle mRNA-Moleküle in cDNA umgeschrieben werden.

Dieser nachfolgende Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert und danach entweder bei -20°C eingefroren oder sofort auf Eis für die Analyse der cDNA weiterverarbeitet.

Standard cDNA-Synthese-Ansatz:

10x Reaktionspuffer	2 µL
dNTP-Mix (je 5 mM)	2 µL
Oligo(dT) Primer (10 µM)	2 µL
RNase Inhibitor (10 U/µL)	1 µL
Omniscript Reverse-RT	1 µL
RNA	1 µg
ddH ₂ O	ad 20 µL

Bei der aus den EMB isolierten RNA erfolgte die cDNA-Synthese wie bei Noutsias et al. beschrieben unter Einsatz des High Capacity Archive Kit der Firma Applied Biosystems (Noutsias et al., 2008).

4.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Durch die Verwendung einer PCR (Mullis et al., 1986) ist es möglich spezifische Nukleinsäuresequenzen *in vitro* zu vervielfältigen. Die PCR läuft in drei Schritten ab. Der DNA-Doppelstrang, welcher den zu amplifizierenden Bereich enthält, wird durch Erhitzen des Ansatzes auf 94°C getrennt (Denaturierung). Nach Abkühlen auf die optimale Temperatur hybridisieren die Primer mit einem komplementären Strang der zu amplifizierenden DNA. Die zugegebene *Taq*-DNA-Polymerase verlängert dann diese Primer. Die Bildung des zweiten Strangs wird durch den Einbau freier dNTPs herbeigeführt. Die *Taq*-DNA-Polymerase zeigt bei hohen Temperaturen (75-80°C) maximale Aktivität. Die Standardreaktion fand jedoch bei 72°C statt. Die genannten Schritte können durch die Temperaturänderungen des Ansatzes mehrere Male nacheinander ablaufen. Dadurch ist es möglich, aus einem DNA-Molekül in 30 Zyklen 10⁹ Stränge zu synthetisieren. Alle Polymerasen wurden gemäß den Herstellerangaben eingesetzt.

Standard-Ansatz für Konventionelle PCR:

10x Reaktionspuffer (5 mM MgCl ₂)	5 µL
10 mM dNTP-Mix (je 2,5 mM)	1 µL
GenTherm DNA-Polymerase (5 U/µL)	0,2 µL
Vorwärts-Primer (10 µM)	1 µL
Rückwärts-Primer (10 µM)	1 µL
cDNA- <i>Template</i> (etwa 50 ng/µL)	1 µL
ddH ₂ O	ad 50 µL

Für die Klonierungs-PCR-Ansätze wurde die spezielle „proofreading“ *Pfu* DNA-Polymerase der Firma Rapidozym (Berlin, D) mit dem dazugehörigen Puffer gemäß Herstellerangaben verwendet.

4.5.1 PCR aus cDNA

Die Reaktion wurde jeweils mit einem Volumen von 20 μL durchgeführt. Es wurden 100 ng cDNA-*Template*, jeweils 10 pmol vom Vorwärts- und Rückwärts-Primer, 2 μL 10 x PCR-Puffer, 2 μL 10 x dNTPs (2 mM) und 0,5 U Polymerase eingesetzt. Mit ddH₂O wurde der Ansatz auf 20 μL Endvolumen aufgefüllt. Als Kontrolle der Reaktion wurde jeweils ein Ansatz ohne *Template* durchgeführt und die fehlende Menge im Ansatz wurde durch ddH₂O ausgeglichen. Alle Ansätze wurden auf Eis zusammenpipettiert und dann in einen auf 94°C vorgeheizten Thermozykler gestellt. Die Primersequenzen und Annealingtemperaturen können den Tabellen in Abschnitt 3.10 entnommen werden.

4.5.2 PCR aus Plasmid-DNA (Kolonie-PCR)

Mit dieser PCR wurden Bakterienkolonien nach erfolgter Klonierung auf Anwesenheit und Größe des hinein ligierten Inserts getestet. In den auf Eis stehenden PCR-Ansatz wurden 2 μL Bakteriensuspension oder eine Bakterienkolonie überführt. Anschließend wurde die verwendete, bakterientragende Pipettenspitze in ein Loch einer mit LB-Medium und Selektionsantibiotikum enthaltenen Mikrotiterplatte gesteckt. Dadurch war es möglich, Klone, die das interessante Insert enthielten, später zu kultivieren. Die verwendeten Primer banden sich teilweise an den Vektor, somit musste bei der Auswertung berücksichtigt werden, dass die Produkte größer als das DNA-Insert waren. Zum Einsatz kamen die Primer aus Tabelle 6.

4.6 DNA-Gelelektrophorese

Durch unterschiedliche Agarosekonzentrationen lassen sich DNA-Fragmente zwischen 100 und 20.000 bp auftrennen.

Im Rahmen der Arbeit wurden 1,5%ige Gele verwendet. Die Agarose wurde in 1 x TAE Puffer durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlen auf etwa 60°C in eine Gelkammer gegossen. Anschließend wurde ein Kamm passender Größe eingesetzt, um die entsprechende Anzahl von Taschen zu erzeugen. Nach Aushärten der Agarose und Entfernen des Kamms wurde das Gel in eine mit 1 x TAE gefüllte horizontale Gelkammer gegeben. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen Ladepuffer versetzt und in die Taschen aufgetragen. Durch die Wahl der angelegten Spannung konnte die Qualität der Auftrennung bestimmt werden. In den Experimenten variierte

die Spannung beim Auftrennen zwischen 60-70 V. Durch Zugabe von Ethidiumbromid (0,2 µg/mL Gel) zur Gelmasse wurde die DNA während der Elektrophorese angefärbt und hinterher auf einem Durchlichtschirm mit ultravioletten Licht sichtbar gemacht.

4.7 Qualitative Real-time PCR (TaqMan®)

Ziel der quantitativen PCR war es, aus der Menge an amplifiziertem PCR-Produkt Rückschlüsse auf die eingesetzte Menge RNA bzw. cDNA zu ziehen und so die Transkriptionshäufigkeit der gewünschten Ziel-Gene zu bestimmen. Während des Annealing-Schrittes binden sich nicht nur sequenzspezifische Primer an die Zielsequenz, sondern auch sequenzspezifische Fluoreszenzsonden. Diese sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FAM) als Reporter und einem Quencher-Molekül (TAMRA) markiert. Da der Quencher die Fluoreszenzemission des Reporters unterdrückt, erhält man anfangs kein Fluoreszenzsignal. Während der Zweitstrangsynthese erreicht die *Taq*-DNA-Polymerase die Sonde. Durch ihre 5'-3'-Exonucleaseaktivität wird die Sonde hydrolytisch gespalten, wodurch Reporter und Quencher getrennt werden. Durch die Anregung des Reporters konnte die Fluoreszenzemission messtechnisch erfasst werden. Die gemessene Intensität der Fluoreszenz war dabei direkt proportional zur Anzahl der neu gebildeten DNA-Stränge und damit proportional zur DNA-Ausgangsmenge. Zur Messung wurde ein ABI 7000 Sequence Detection System verwendet. Die anschließende Auswertung erfolgte mit der firmeneigenen SDS-Software Version 2.0.

Da alle Gene gleichzeitig mit dem gleichen Temperaturprogramm gemessen wurden, war darauf zu achten, dass alle Primer eine annähernd gleiche Annealingtemperatur aufwiesen.

Ist die Fluoreszenzzunahme größer als der Schwellenwert (Threshold), d.h. der Bereich, der sich aus der Schwankungsbreite der Basisfluoreszenz der PCR-Reaktionen während der ersten Zyklen errechnet und auch mehrere Zyklen meßbar ist, so wird dieser Zyklus der jeweiligen Probe als C_t Wert (*Threshold Cyclus*) zugewiesen.

Jede Probe wurde mindestens dreimal quantifiziert und anschließend auf die Expression eines stabil exprimierten Genes (= Houskeeping-Gen) bezogen, um Fluktuationen bei den eingesetzten cDNA Mengen und der Reaktionseffizienzen zu korrigieren.

Standardprotokoll: TaqMan® Real-time PCR

2x TaqMan Universal PCR Master Mix	12,5 µL
No AmpErase® UNG	
Primer-Mix (je 20 µM)	0,5 µL
Sonde (10 µM)	0,3 µL
cDNA- <i>Template</i> (10 ng – 1 µg)	3 µL
ddH ₂ O	ad 25 µL

Das obige Protokoll zeigt das Pipettierschema der TaqMan® Real-time PCR an. Der Ablauf der PCR verlief wie folgt: 2 min 50°C, 10 min 95°C, 15 s 95°C, 1 min 60°C; 40 Zyklen.

4.7.1 TaqMan® Real-time PCR mit SYBR® Green I

Die Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene aus Mauszellen wurde ohne fluoreszenzmarkierte sequenzspezifische Sonden durchgeführt. Zum Detektieren der amplifizierten DNA-Fragmente wurde dem TaqMan® Universal Master Mix der Farbstoff SYBR® Green I zugesetzt. SYBR® Green I hat die Eigenschaft bei Anwesenheit von doppelsträngiger DNA ein Fluoreszenzsignal im grünen Bereich des Spektrums des sichtbaren Lichtes abzugeben. Die Expression von GAPDH (Housekeeping-Gen) wurde für jede Probe als Kalibrator benutzt. Anhand von Schmelzkurven am Ende jeder Reaktion wurde die Spezifität der amplifizierten Produkte überprüft. Des Weiteren wurden die Amplifikate auf einem Agarosegel analysiert. Die verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 2 angegeben.

4.7.2 PreAmp TaqMan® Real-time PCR

Da die RNA und somit cDNA Ausbeute aus den humanen EMB sehr gering war, wurde eine kürzlich beschriebene Methode verwendet, bei der die cDNA mittels genspezifischer Primer über mehrere PCR-Zyklen voramplifiziert (PreAmp) wird (Noutsias et al., 2008).

Die verwendeten TaqMan® Assays (Applied Biosystems) und selbst designten Assays (3.10; Tabelle 3 und 4) wurden mit 1 x TE Puffer (Endkonzentration von 0,2-fach), wie vom Hersteller vorgegeben, gemischt (Applied Biosystems). Der PreAmp-Reaktionansatz enthielt 6,25 µl cDNA, 12,5 µL TaqMan® PreAmp Master Mix und 6,25 µl Primermixtur (0,2-fach jeder Assay) in einem Endvolumen von 25 µL. Die Reaktion lief in einem Thermozykler über 14 Zyklen mit dem folgenden

Programm: Denaturieren bei 95°C für 10 min und 14 Zyklen der Amplifikation (15 s 95°C, 4 min 60°C). Die PreAmp-Produkte wurden anschließend in TE Puffer 1:20 verdünnt (Endvolumen 500 µL) und als *Template* für eine TaqMan® Real-time PCR wie vorhergehend beschrieben eingesetzt. Die Expression von Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) wurde als Kalibrator benutzt.

4.7.3 LowDensity-Array

Zur Analyse der Genexpressionen aus murinen Myokardgeweben der tierexperimentellen MC-Studie kamen die kommerziellen Multifluidcards der Firma Applied Biosystems zum Einsatz. Unter Verwendung dieser Karten lassen sich im 384-well Maßstab die Genexpressionen verlässlich, kostengünstig und schnell auf dem ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems) bestimmen.

Gesamt-RNA aus Mausherzgewebe wurde unter Verwendung des High Capacity cDNA Archive Kit in cDNA umgeschrieben und in der Reaktion eingesetzt. Die verwendeten Assays sind in Abschnitt 3.10 (Tabelle 1) angegeben und ebenfalls auf der Webseite von Applied Biosystems hinterlegt. Als internes Haushaltsgen bzw. Kalibrator wurde die Expression von ribosomaler 18S RNA (rRNA) verwendet.

4.8 Immunohistochemie und Fluoreszenzfärbungen

Zum Nachweis der Lokalisation von bestimmten Proteinen innerhalb der Zellen bzw. eines Gewebes wurden Immunohistochemie oder indirekte Immunfluoreszenz angewandt. Die Färbungen wurden sowohl an Gefrier- und Paraffinschnitten als auch an Zellkulturpräparaten durchgeführt. Die verwendeten Antikörper und deren Verdünnungen sind in Tabelle 8 angegeben.

Tabelle 8. Primäantikörper-Verdünnungen für den Nachweis bestimmter Antigene in Gewebeschnitten oder Zellkulturpräparaten; (m) monoklonal, (p) polyklonal.

Primäantikörper	Verdünnung
Anti-aktive Caspase 3 (m)	1:100
Anti-Maus CD3 (m)	1:75
Anti-Desmin (m)	1:100
Anti-Maus MAC3 (m)	1:75
Anti-Maus TF (p)	1:50
Anti-Maus VCAM-1 (m)	1:75

Carbazol-Färbung

Zum immunhistochemischen Nachweis von Antigenen und derer Lokalisation wurde die Carbazolfarbreaktion verwendet. Gewebeschnitte wurden in PBS gewaschen und die endogene Peroxidase mit 0,9% H₂O₂ in ddH₂O für 10 min inaktiviert. Anschließend wurden die Schnitte in PBS überführt. Außerdem wurde vorhandenes Avidin und Biotin mit dem Avidin-Biotin-Kit nach Herstellerangaben geblockt. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Objektträger mit dem Primärantikörper (siehe 3.9 und Tabelle 8) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Herauswaschen der nichtgebundenen ersten Antikörper erfolgte die Inkubation mit den sekundären Antikörpern. Dieser Antikörper war entweder biotinyliert oder mit HRP konjugiert. Für die Detektion des biotinylierten Antikörpers wurde das Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, Californien, CA, USA) verwendet. Nach der Gegenfärbung mit Hematoxylin (Merck, Darmstadt, D) erfolgte ein Eindeckeln in Gelatine.

Paraffinschnitte wurden zuerst mittels Xylol deparaffiniert und durch eine absteigende Ethanolreihe rehydriert. Anschließend wurde die endogene Peroxidase wie beschrieben inhibiert und die Antigen-Epitope durch einen Trypsinverdau (1 mg/mL, 10 min, 37°C) freigelegt. Anschließend erfolgte die Färbeprozedur der Schnitte, wie oben beschrieben.

Fluoreszenzfärbung und Konfokalmikroskopie

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie baut auf dem Prinzip der Auflichtfluoreszenzmikroskopie auf. Dabei wird allerdings nur das Licht aus einem definierten Fokus des Präparates von Photomultipliern detektiert und anschließend aus den Signalen der abgerasterten Ebenen vom Computer ein Bild berechnet. Dieses stellt die Strukturen einer Bildebene ohne Überlagerung durch andere Bildebenen des Präparates dar.

Zur Ko-Lokalisation verschiedener Fluoreszenzmarker wird das Fluoreszenzlicht in verschiedene spektrale Bereiche zerlegt, die simultan mit verschiedenen Detektoren verarbeitet werden können. Die digitalisierten Fluoreszenzsignale von jedem Detektor werden als getrennte Kanäle im Computer gespeichert und können mittels der TCS-NT Software überlagert werden. Zur Anregung der Fluorochrome wurden ein Ar/Kr- und ein He/Ne-Laser verwendet.

Kardiomyozyten wurden ca. 80% konfluent in Chamber Slides™ (Objektträger mit Kammerstruktur) ausgesät. Nach erfolgter Adhärenz wurden die Zellen je nach

Methoden

Versuchsanordnung behandelt. Daraufhin wurde das Stimulationsmedium abgesaugt und die Kammer vom Objektträger entfernt. Die Zellen wurden anschließend mit 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Präparate für 30 min bei Raumtemperatur mit einer PBS-Lösung geblockt, der 2% BSA und 5% Ziegenserum zugesetzt wurden. Nach der Blockade folgte eine Inkubation mit den Primärantikörpern (60 min bei RT). Als Negativkontrolle diente die Inkubation von separaten Objektträgern mit Immunglobulinen aus nicht immunisierten Tieren, aus der der Primärantikörper stammte. Zur Detektion wurden Fluoreszenz-markierte Sekundärantikörper eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 45 min im Dunkeln wurde letztendlich die Kernfärbung mit TO-PRO 3 durchgeführt. Die Präparate wurden anschließend mit Gelatine eingedeckelt. Die Verdünnungen der Primärantikörper sind in Tabelle 8 angegeben, die Sekundärantikörper wurden 1:100 verdünnt. Die konfokal-mikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit dem Leica DM IRBE.

F-Aktin Nachweis mittels Phalloidin

Um zelluläres F-Aktin nachzuweisen wurden die Kardiomyozyten auf beschichteten Objektträgern kultiviert. Nachfolgend wurden die Zellen mit TNF- α (10 ng/mL) nach Vorinkubation mit spezifischen Inhibitoren stimuliert. Zum Färben wurden die behandelten Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 10 min bei RT mit 3,7% PFA fixiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Zellen mit einer 0,1% Triton X-100 Lösung für 5 min permeabilisiert und erneut mindestens dreimal gewaschen. Anschließend wurde die Färbelösung mit fluoreszenzmarkierten Phalloidin (2 U/mL Phalloidin-MFP547, 1% BSA in PBS) für 30 min bei RT auf den Zellen im Dunkeln inkubiert. Nach erneuten Waschschritten erfolgte die Kernfärbung wie schon beschrieben mit TO-PRO 3. Die gewaschenen Objektträger wurden mit Gelatine eingedeckelt und für die Mikroskopie bei 4°C dunkel gelagert.

In situ-Färbung von FVIIa

Aktiver und thrombogener TF wurde mittels eines Bindungsnachweises von FVIIa, wie durch Gertz und Mitarbeiter beschrieben, nachgewiesen (Gertz et al., 1998). Entparaffinierte Schnitte von Mausherzen wurden rehydriert (siehe oben), mit dem Avidin-Biotin-Blocking-Kit geblockt und in Ca²⁺-haltigen TBS (5 mM CaCl₂, pH 7.5) dreimal gewaschen. Anschließend wurden die Gewebe mit 50 nM Biotin-

konjugiertem, rekombinantem FVIIa für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligen Waschen mit Ca²⁺-haltigem TBS wurden die Myokardschnitte für 5 min bei 37°C mit 4% PFA fixiert. Der Nachweis des gebundenen biotinylierten-FVIIa erfolgte durch anschließende Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin (1:200, MFP-488) oder HRP-markiertem Streptavidin (1:200). Kontrollfärbungen wurden mit unmarkiertem FVIIa durchgeführt. Als weitere Kontrolle wurden die Schnitte vor Zugabe mit biotinyliertem FVIIa mit unmarkiertem FVIIa oder gegen TF-gerichtete Antikörper vorinkubiert. Die Detektion des gebundenen FVIIa erfolgte im Fluoreszenzmikroskop oder für das HRP-markierte Streptavidin mittels der Carbazol-Methode.

4.9 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein optisches Messsystem zur fluoreszenzabhängigen multiparametrischen Analyse von Zellen bzw. Zellpartikeln in Suspension. Durch die umgebende Trägerflüssigkeit (FACS-Flow) werden die Zellen bzw. Partikel derart beschleunigt, dass sie aufgetrennt und aneinandergereiht am Laserstrahl vorbeitransportiert werden. Dieses Prinzip wird als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet. Die Zelle emittiert dabei Streulicht und, wenn entsprechend markierte Antikörper gebunden sind, Fluoreszenzimpulse, woraus man unterschiedliche Eigenschaften der Zelle ableiten kann.

Hierzu dienen mehrere Parameter: das Vorwärtsstreulicht FSC (*Forward Scatter*) wird durch Beugung des Lichts hervorgerufen und dient als Maß für die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht SSC (*Side Scatter*) wird durch Brechung des Lichts hervorgerufen und dient als Maß für die Granularität (u.a. Größe und Struktur des Zellkerns). Mit diesen beiden Parametern lassen sich zum Beispiel die Zellen des Blutes bereits recht gut auftrennen. Zudem wird die Probe vorher mit fluoreszierenden Farbstoffen inkubiert. Diese können z.B. an Antikörpern gebunden sein oder, wie z.B. Propidiumiodid direkt mit Zellbestandteilen reagieren. Antikörper sind meist gegen bestimmte Oberflächenmerkmale gerichtet. Nach Markierung kann dann auch die Sortierung nach diesen Merkmalen erfolgen. Durch Einsatz verschiedenfarbiger Laser kann die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe und damit die Informationsdichte erhöht werden.

Der in dieser Arbeit verwendete FACScanTM verfügt als Lichtquelle über einen luftgekühlten Argonlaser ($\lambda=488$ nm) und ist somit für die Anregung gängiger

Fluorochrome wie z.B. Fluorescein-isothiocyanat (FITC; $\lambda=525$ nm) geeignet. Das Durchflusszytometer ist in der Lage, Signale sowohl im logarithmischen als auch im linearen Modus zu messen. Parameter, die einen hohen Empfindlichkeitsbereich erfordern, wie in dieser Arbeit die Messung von Mikropartikeln, sollten im logarithmischen Modus gemessen werden, da Signale mit geringer Intensität hierbei gespreizt und mit höherer Intensität gestaucht werden. Die Auswertung der Versuche wurde mit Hilfe der CellQuest®-Software durchgeführt.

4.9.1 Fluoreszenzmarkierung von Zellen

Zum Markieren der Zellen wurde der Fluoreszenzfarbstoff Carboxy-Fluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) verwendet. CFSE ist ein für die Zellen nicht toxischer Vitalfarbstoff. Nach der passiven Aufnahme wird der Farbstoff durch Esterasen gespalten und lagert sich irreversibel an alle zellulären Protein an. Durch die Spaltung wird aus dem farblosen, das bei 488 nm fluoreszierende CFSE (Abbildung 8).

Für eine gleichmäßige Färbung wurden 10^6 Zellen in 1 mL PBS aufgenommen, mit 5 μ M CFSE versetzt und bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf von 7 min wurde die CFSE-Aufnahme der Zellen mit dem 5-fachen Volumen an eiskaltem FBS-haltigen Medium für 5 min auf Eis gestoppt. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, in geeignete Kulturgefäße überführt und für die weiteren Versuche verwendet.

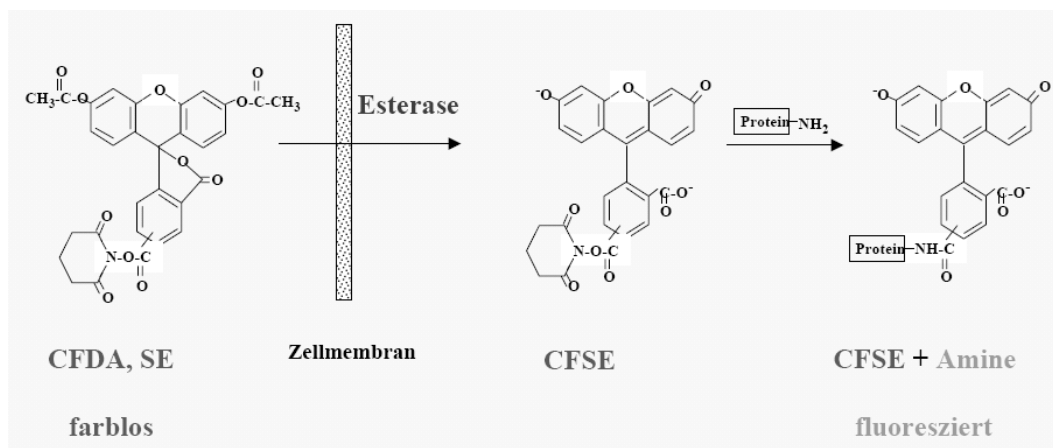


Abbildung 8. Fluoreszenzmarkierung von Zellen mit Carboxy-Fluorescein Succinimidyl Ester (CFSE). Farbloses CFSE wird passiv von den Zellen aufgenommen, durch zelluläre Esterasen gespalten (aktiviert) und an zelluläre Proteine angelagert. Die Proteine sind somit fluoreszenzmarkiert. Die gefärbten Zellen sind im FL-1-Kanal (488 nm) des Durchflusszytometers detektier- und analysierbar.

4.10 Isolation und Quantifizierung von Mikropartikel

Isolation aus Zellkulturüberständen

Konditionierte Zellkulturüberstände (2 mL) stimulierter und unstimulierter HL-1 Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten in Reaktionsgefäße überführt. Danach wurden die Proben zentrifugiert (300 x g, 10 min, 4°C), um tote Zellen und Zellrückstände zu entfernen. Die verbleibenden Überstände wurden abschließend bei 17.000 x g für wenigstens 60 min zentrifugiert und die Überstände verworfen. Das Mikropartikel (MP)-Pellet wurde für weitere Untersuchungen (s. Abschnitt 4.14) verwendet oder umgehend der Tissue Factor-Aktivitätsmessung (s. Abschnitt 4.11) unterzogen.

Isolation von zirkulierenden Mikropartikel aus Plasma von Patienten mit myokardialen Verletzungen

Plättchen-armes Plasma (PAP) wurde aus humanen Zitrat-Plasma mittels Zentrifugation gewonnen (4.000 x g, 15 min, 4°C). Das PAP (1 mL) wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die MP durch Ultrazentrifugation wie bereits im Abschnitt beschrieben isoliert. Die gewonnenen MP-Pellets wurden mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das gewaschene trockene MP-Pellet wurde dann für weitere Versuche bei -80°C gelagert.

Quantifizierung der Mikropartikel-Freisetzung von murinen Kardiomyozyten

Zur Bestimmung der MP-Freisetzung in den Zellkulturüberstand, wurden die unterschiedlich konditionierten Überstände der Kardiomyozyten abgenommen und mittels Durchflusszytometrie sofort analysiert. Die Anzahl der gemessenen Ereignisse innerhalb von 30 s wurde auf das Mediumvolumen und die Anzahl der kultivierten Zellen bezogen.

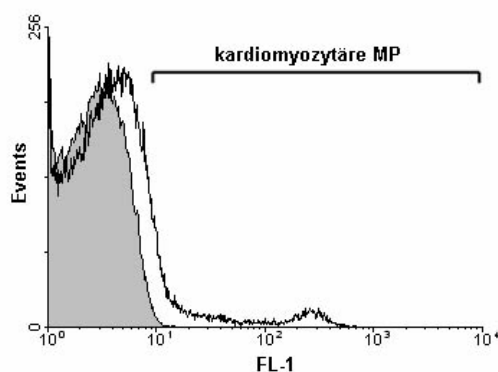


Abbildung 9. Repräsentative Histogram-Darstellung einer durchflusszytometrischen Bestimmung der Mikropartikel (MP) von unterschiedlichen Zelltypen. Kardiomyozyten wurden mit CFSE gefärbt und mit ungefärbten Endothelzellen in einem Zwei-Kammersystem ko-kultiviert. Gezeigt sind ungefärbte endotheliale MP (grau-gefüllte Fläche) und MP aus dem unteren endothelialen Kompartiment die eine Mixtur aus endothelialen und CFSE-gefärbten kardiomyozytären MP besteht. Der Schwellenwert (Klammer) für CFSE-positive MP (MP von HL-1 Kardiomyozyten) wurde bei 1% aller ungefärbten MP gesetzt.

Zur Bestimmung der Diffusionsrate von kardiomyozytären MP wurden die Kardiomyozyten mittels CFSE farbmarkiert (4.9.1) und mit unmarkierten Endothelzellen ko-kultiviert. Nach Behandlung wurden aus den einzelnen Kompartimenten die konditionierten Überstände entnommen und ebenfalls unter Verwendung des Durchflusszytometers analysiert (siehe oben). Zum Unterscheiden der kardiomyozytären CFSE-markierten MP von ungefärbten, endothelialen MP wurde die Verstärkung des FL-1-Kanals so gewählt, dass nicht CFSE-gefärbte MP ihr Maximum innerhalb der ersten Dekade zwischen 10^0 und 10^1 haben (Abbildung 9). Anschließend wurde der Marker so gesetzt, dass nur 1% der ungefärbten MP gezählt wurden (Abbildung 9). Die MP-Mengen in den Überständen der Diffusionsversuche wurden anschließend anhand dieser Einstellung quantifiziert und auf das jeweilige Mediumvolumen bezogen.

4.11 Bestimmung der Tissue Factor-Proteinaktivität

4.11.1 Zelluläre und Mikropartikel-assoziierte Tissue Factor-Aktivität

Die funktionelle Aktivität vom TF-Protein lässt sich aus der Bildung des aktivierten FX (FXa) bestimmen. Wie aus Abbildung 1 ersichtlich, spaltet der TF/FVIIa Komplex FX entweder direkt oder indirekt über eine FIX-Aktivierung. Der

hier verwendete Assay beruht auf der direkten Aktivierung von FX. Der entstehende FXa spaltet das chromogene Substrat Spectrozyme FXa, wobei der Farbstoff p-Nitroanilid abgespalten wird, dessen spezifische Extinktion bei 405 nm photometrisch bestimmt werden kann. Die Bildung von FXa ist proportional abhängig zur TF-Aktivität. Die für den Assay benötigten Blutgerinnungsfaktoren wurden dabei in Form des Arzneimittels NovoSeven® (rekombinanter FVIIa) bzw. durch humanen FX zugefügt. Der Test verläuft ohne Anwesenheit der antikoagulatorischen Proteasen Antithrombin III und Protein C, die unter physiologischen Bedingungen zugegen sind. Die *in vitro*-Versuchsbedingungen entsprechen nicht physiologischen Bedingungen, da nur prokoagulatorische, nicht jedoch antikoagulatorische Bedingungen (bis auf endogene Antikoagulantien wie TFPI) berücksichtigt werden.

Zur Messung der prokoagulatorischen Aktivität wurden 10.000 Zellen in 200 µL Aktivitätspuffer aufgenommen, dem 0,1 M n-Octyl-β-D-Glycopyranosid zum Lysieren der Zellen zugesetzt wurde. Die Lyse der Zellen erfolgte für 15 min bei 37°C. Für die Messung von MP-assoziiierter Prokoagulabilität wurden wie in Abschnitt 4.10 isolierten MP in 200 µL Aktivitätspuffers lysiert. In einer 96-well Mikrotiterplatte wurden 100 µL der Zellsuspension zu 50 µL FVIIa-Lösung (Endkonzentration 2 nM) pipettiert und wiederum für 10 min bei 37°C inkubiert. Direkt nach der Zugabe von 50 µL FX (Endkonzentration 150 nM) zur Probe wurde über einen Zeitraum von 4 min jede Minute 40 µL abgenommen und in 100 µL 25 mM EDTA-Lösung pipettiert, wodurch die Bildung von FXa durch den Ca²⁺-Entzug gestoppt wurde. Der Anstieg der optischen Dichte wurde nach Zugabe von Spectrozyme fXa (0,5 mM Endkonzentration) 30 min (37°C) lang in einem ELISA-Reader bei 405 nm photometrisch bestimmt. Der Umrechnung der optischen Dichte (OD) in Aktivitätseinheiten, die ein Maß für die Umsetzung von FX zu FXa darstellt, wurden Messungen von Konzentrationsreihen unter Verwendung von lipidiertem, rekombinant hergestelltem Tissue Factor zugrunde gelegt, wobei eine Einheit der Aktivität von 1 pg humanem, lipidiertem, rekombinatem Tissue Factor entspricht.

4.11.2 Herstellung von Phospholipidvesikeln

Die Phospholipide L-α-Phosphatidylcholin (PC) und L-α-Phosphatidylserin (PS) wurden im molaren Verhältnis 80:20 gemischt, getrocknet und anschließend in HBS-Puffer (Phospholipid-Endkonzentration 1 mM) resuspendiert. Die entstandenen multilamellaren Vesikeln wurden anschließend im Ultraschall-Bad in kleine,

unilamellare Vesikel zerteilt. Die Ultraschall-Behandlung wurde solange fortgesetzt bis die anfangs milchige Lösung fast klar war. Die Phospholipidvesikel wurden bei 4°C gelagert.

4.11.3 Tissue Factor-Aktivität in Blutplasma

Zur Bestimmung der TF-Aktivität in Blutplasma wurden 20 µL Zitratplasma mit 160 µL Aktivitätspuffer und 20 µL Phospholipidvesikelsuspension (4.11.2) für 15 min bei 37°C inkubiert. Der anschließende FXa-Generationsassay erfolgte wie oben beschrieben (4.11.1).

4.12 Analysen zum Wachstumsverhalten von Zellen

4.12.1 Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit mit CFSE

Wie in 4.9.1 beschrieben dringt CFSE passiv in das Zellinnere ein und bindet dort irreversibel an zelluläre Proteine. Sobald intrazelluläre Esterasen den Ester hydrolysieren, fängt er an zu fluoreszieren. Die Fluoreszenz von CFSE hält in ruhenden Zellen über Monate an und ihre Intensität halbiert sich in proliferierenden Zellen bei jeder Teilung. Man kann also allein an der Abnahme der Fluoreszenz beobachten, ob sich die Zellen teilen oder nicht.

HL-1 Zellen wurden wie in 4.9.1 mit CFSE gefärbt und in einer beschichtete 12-well Kulturschale ausgesät. Nach jeweils 24 h wurden die Zellen vom Boden abgelöst und mittels Durchflusszytometrie die CFSE-Signalstärke der Zellen im FL-1 Kanal bestimmt (Abbildung 10).

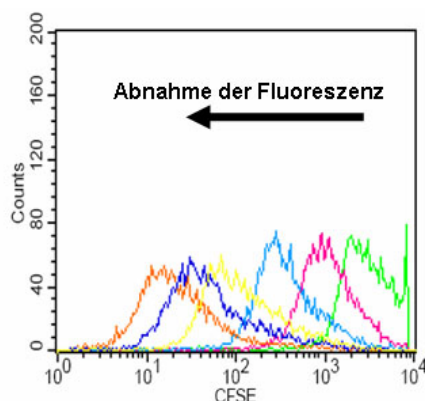


Abbildung 10. Bestimmung des Wachstumsverhaltens mittels CFSE Färbung. Jede einzelne farbige Kurve ist eine separate Messung von CFSE-gefärbten HL-1 Zellen im FL-1 (FITC)-Kanal des Durchflusszytometers. Die mittlere CFSE-Intensität wurde ermittelt und mit den Messwerten des Vortags verrechnet. Die Abbildung zeigt eine Überlagerung von sechs repräsentativen Messungen der Kontrollzellen mit dem leeren Expressionsplasmid.

4.12.2 Zellzyklus-Analyse mittels Propidiumiodid-Anfärbung

Um die verschiedenen Phasen des zellulären Teilungszyklus (DNA-Gehalt) sichtbar zu machen, werden die zu untersuchenden Zellen mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Propidiumiodid inkubiert. HL-1 Zellen wurden über zwei Tage in einer 6-well Multiplatte mit Wachstumsmedium inkubiert und anschließend geerntet. Die pelletierten Zellen wurden mit 70%igem Ethanol über Nacht bei 4°C fixiert. Am nächsten Tag wurden die fixierten Zellen pelletiert und in Propidiumiodidfärbelösung (100 µg/mL RNase, 40 µg/mL Propidiumiodid in PBS) für 30 min bei 37°C gefärbt. Nach Waschen der Zellen mit FACS-Lösung erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer.

4.12.3 Expressionsanalyse des Proliferationsmarkers Ki67

Zur Bestimmung der Unterschiede in der Teilungsgeschwindigkeit verschiedener HL-1 Zelllinien wurde die Expression des Proliferationsmarkers Ki67 ermittelt. Während des Zellzyklus wird dieses Antigen in der G1-, der S-, der G2- und in der M-Phase exprimiert. Ruhende Zellen, also Zellen, die sich in der G0-Phase befinden, exprimieren das Ki67-Antigen nicht (Matsuura et al., 2004).

Nach angemessener Inkubation im Wachstumsmedium wurden die Zellen geerntet und mit dem monoklonalen Ki67 Antikörper (1:50) gefärbt. Die Antigenexpression wurde im Durchflusszytometer analysiert.

4.13 Apoptoseassays

Apoptosenachweis mittels Annexin V/ Propidiumiodid-Doppelfärbung

Phosphatidylserin (PS) befindet sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran einer lebenden Zelle. Während der Apoptose wird PS auf die Außenseite der Membran transloziert. Annexin V bindet an PS. Durch Markierung von Zellen mit Annexin V – FITC kann man apoptotische Zellen durchflusszytometrisch nachweisen. Werden Zellen nekrotisch und ihre Membran durchlässig, kann Annexin V – FITC in die Zellen eindringen und sich an die Innenseite der Membran binden. Infolgedessen können bei alleiniger Färbung von Zellen mit Annexin V – FITC apoptotische nicht von nekrotischen unterschieden werden. Man kombiniert daher die Annexin V – FITC Markierung mit einer Propidiumiodidfärbung. Das Propidiumiodid (PI) dringt nur in Zellen mit durchlässiger Membran, also in nekrotische Zellen ein. Lebende Zellen sind somit Annexin-negativ und PI-negativ,

apoptotische Zellen sind Annexin-positiv und PI-negativ, nekrotische Zellen sind Annexin-positiv und PI-positiv.

Zu untersuchende Zellen wurden in einer geeigneten Zellkulturplatte ausgesät (3×10^4 Zellen pro cm^2) und wie oben beschrieben für einen Tag im Wachstumsmedium kultiviert. Nach Aushungern (24 h) der Zellen durch Serumentzug wurden die Zellen für 17 h mit unterschiedlichen Apoptose-induzierenden Substanzen in serumfreiem DMEM behandelt. Wahlweise wurde eine Stunde vor Stimulation eine Inkubation mit dem spezifischen AKT-Inhibitor Triciribine durchgeführt (Gao et al., 2007). Am nächsten Tag erfolgte das vorsichtige Ablösen mit Trypsin/ EDTA und Pelletieren der Zellen (10 min, 300 x g, 4°C). Danach wurden die Zellen unter Verwendung des Apoptoseassays (Annexin V – FITC) der Firma MoBiTec nach Herstellerangaben gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

Nachweis von aktiver Caspase 3

Caspasen sind eine Familie von Proteasen mit einem Cystein im aktiven Zentrum. Sie spalten Peptidbindungen C-terminal vom Aspartat. Caspasen sind die wichtigsten Enzyme der Apoptose, dem programmierten Zelltod. Sie sind damit essentiell für die Antwort einer Zelle auf Umwelteinflüsse (z.B. durch Strahlung oder Zytokin-Stimulation) oder Infektion durch Viren. Zum Auslösen des Zelltods werden Initiator-Caspasen (z.B. Caspase 8 und 9) aktiviert. Diese wiederum spalten die Pro-Formen nachgeschalteter Caspasen (wie Caspase 3, 7 und 6), wodurch diese aktiviert werden und schließlich den Zelltod verursachen.

In dieser Arbeit wurde die Aktivierung der Effektor-Caspase, Caspase 3, im Durchflusszytometer untersucht. Dazu wurden die Zellen ausgesät, durch Serumentzug ausgehungert und anschließend stimuliert. Nach Ernte der Zellen wurden diese mit einem spezifischen Antikörper gegen Caspase 3 (3.9) gefärbt.

4.14 Protein-biochemische Analysen

4.14.1 Protein-Isolation

Nach entsprechender Stimulation wurden die HL-1 Zellen zweimal mit eiskaltem PBS (4°C) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe von vorgewärmtem Trypsin-EDTA abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (500 x g, 5 min) wurde der Überstand entfernt, das Pellet in eiskaltem RIPA-Puffer resuspendiert, dem zuvor sowohl Protease- als auch Phosphatase-Inhibitor-Cocktail

laut Herstellerangaben hinzugefügt wurde, und für 30 min auf Eis lysiert. Anschließend wurde das Gemisch 30 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Gehaltsbestimmung bei -80°C gelagert.

4.14.2 Protein-Bestimmung

Die Bestimmung des gesamten Proteingehalts einer Probe erfolgte mit Hilfe des BCA-Protein Assay Kits. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass die Cu-Ionen im Natriumsalz der Bicinchoninsäure, die durch die Aminosäuren Serin, Cystein oder Threonin der Proteine von Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert werden, und so in alkalischer Lösung einen farbigen Komplex gebildet wird. Dieser Komplex kann anhand der Extinktion bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch detektiert werden. Mittels einer Standardkurve wurde der Proteingehalt der zu untersuchenden Probe errechnet. Die Durchführung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers.

4.14.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Proteins im elektrischen Feld hängt neben seiner Größe auch von seiner Ladung ab. Bei der SDS-PAGE werden die Proteine mit Natriumdodecylsulfat denaturiert und erhalten dadurch eine definierte negative Ladung. Um zusätzlich eine schärfere Bandentrennung zu erreichen, wird über das Trenngel ein Sammelgel gegossen, in dem die Proteine fokussiert werden. Da die zu trennenden Proteine ein Molekulargewicht zwischen 30 und 50 kDa aufweisen, wurde ein Gel mit einem Acrylamid-Anteil von 12% eingesetzt. Die Proteinpräparationen wurden mit Probenpuffer versetzt und auf ein Endvolumen von 25 μL eingestellt, kurz zentrifugiert und 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben in die Taschen des Sammelgels (Acrylamid-Gehalt 4%) aufgetragen. Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurde ein Farbmarker verwendet, in dem Proteine mit definiertem Molekulargewicht enthalten sind. Die Auftrennung erfolgte zunächst bei 35 mA. Nachdem die Bromphenolblaubande des Probenpuffers in das Trenngel gelaufen war, wurde eine Stromstärke von 60 mA angelegt. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Bromphenolblaubande den Boden des Trenngels erreicht

hatte. Alle Elektrophoreseschritte erfolgten auf Eis, um einen gleichmäßigen Probenlauf im Gel zu gewährleisten.

4.14.4 RhoA-Aktivitätsassay

Die zelluläre Aktivierung von RhoA wurde mit dem kommerziellen Rhotekin Rho Binding Domain (RBD) Kit der Firma Upstate nachgewiesen. Der Hauptbestandteil des verwendeten Assays ist ein GST-Fusionsprotein, welches spezifisch an aktiviertes RhoA (GTP-Rho) bindet.

Die zu untersuchenden Zellen wurden nach 1 h Inhibitorenvorinkubation mit TNF- α für 4 h stimuliert und anschließend mit eiskaltem PBS gewaschen und in eiskaltem Phosphatase- und Protease-haltigen MLB Puffer (25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1% Igepal CA-630, 10 mM MgCl₂, 1mM EDTA, 10% Glycerol, pH 7,5) lysiert. Den Lysaten wurden mittels Zentrifugation (14.000 x g, 5 min, 4°C) die Zelltrümmer entzogen und der gewonnene Überstand für weitere Untersuchungen bei -80°C gelagert. Zum Nachweis von phosphorylierten RhoA wurden den gereinigten Zelllysaten 5 μ g der Rhotekin RBD-Agarose zugegeben und bei 4°C über 45 min schüttelnd inkubiert. Nach Pelletieren und zweimaligem Waschen (MLB Puffer) der Agarose-Kügelchen wurde das Pellet in 40 μ L RIPA-Puffer aufgenommen und nach Versetzen mit Ladepuffer aufgekocht (5 min, 95°C). Die Proben wurden anschließend wie in 4.14.3 und 4.14.5 beschrieben aufgearbeitet. Zur Detektion des immunpräzipitierten RhoA kam der monoklonale RhoA-Antikörper (3 μ g/mL; Tabelle 9) zum Einsatz.

4.14.5 Immun-Blot (Western Blot)

Als Western Blot bezeichnet man den Transfer und die Immobilisierung von Proteinen auf die Oberfläche einer immobilisierten Membran mit anschließender Identifizierung von Proteinen in komplexen Proteingemischen mittels spezifischer Antikörper.

Nach der Auftrennung der Proteine durch die SDS-PAGE wurde das Gel ebenso wie die Filterpapiere ca. 5 min im Transferpuffer äquilibriert. Die hydrophobe PVDF-Membran wurde durch ein 30 sekündiges Waschen in Methanol verwendbar gemacht, da beim Proteintransfer hydrophile Lösungen verwendet wurden. Nach zweimaligem Waschen mit Wasser wurde sie für 5 min in Transferpuffer getränkt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte in der Regel innerhalb von

30 min bei 5 W mittels der *semi-dry* Methode. Nach erfolgreicher Übertragung der Proteine wurde zum Verhindern von unspezifischen Bindungen die Membran 60 min in 5% Magermilch-Lösung (TBS-Tween) gelegt. Anschließend wurde die Membran dreimal mit TBS-T für 5 min gewaschen und über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper (siehe Tabelle 9) inkubiert. Ungebundene und unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit TBS-T Puffer für 5 min entfernt. Der Peroxidase gebundene Sekundärantikörper (1:5000 verdünnt in 5% Magermilch-Lösung) wurde 60 min mit der Membran inkubiert und anschließend dreimal mit TBS-T gewaschen. Zur Visualisierung der spezifischen Proteinbanden wurde das ECL plus Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet. Anschließend wurde in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm für 30 s bis 5 min belichtet und im Filmentwicklungsgerät (Kodak) entwickelt.

Tabelle 9. Primärantikörper-Verdünnungen für Western Blot; (m) monoklonal, (p) polyklonal.

Primärantikörper	Verdünnung
Anti-humaner TF (p)	1:300
Anti-Maus TF (p)	1:50
Anti-Maus TFPI (p)	1:50
Anti-Sarkomeres Myosin (m)	1:100
Anti-Kardiales Actin (m)	1:100
Anti-RhoA (m)	1:70

4.15 Klonierung von DNA-Fragmenten

Die Klonierung von DNA dient zur Vermehrung von rekombinanter DNA, d.h. von einem DNA-Fragment, das in ein Plasmid experimentell eingefügt wird. In dieser Arbeit wurde der gesamte Protein-kodierende Abschnitt der murinen TF-cDNA in das pcDNA3.1-Expressionsplasmid kloniert. Durch die Klonierung in den pcDNA3.1-Vektor gelangt die TF-cDNA hinter einen starken Promoter (Cytomegalievirus-Promoter) dadurch kommt es zu erhöhten Expressionsraten in eukaryotischen Zellen.

Im zweiten Ansatz wurde ein short-hairpin-RNA (shRNA)-kodierendes DNA-Fragment in den Tetrazyklin-induzierbaren shRNA-Expressionsvektor (pENTR/H1/TO) kloniert. Durch Einsatz dieses Vektors kann man die Expression der gewünschten shRNA in Säugerzellen regulieren. Die shRNA war so konzipiert, dass sie spezifisch gegen murinen TF-mRNA gerichtet war (Tabelle 7).

4.15.1 Restriktionsenzymverdau

Restriktionsendonukleasen schneiden DNA an spezifischen, meist palindromischen Sequenzen, die häufig aus 4-6 bp bestehen. Dabei entstehen entweder glatte oder überhängende Enden.

Die zu spaltende DNA wurde mit einem Zehntel des Endvolumens des vom Hersteller mitgelieferten 10-fach konzentrierten Puffers gemischt. Nach Zugabe der berechneten Menge Wasser wurden pro μg DNA eine Unit Restriktionsenzym (3.5) zugegeben. Der Ansatz wurde gut durchmischt und bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur für 1-3 h inkubiert. Danach wurde das Enzym inaktiviert, indem der Ansatz, wie vom Hersteller vorgeschlagen, behandelt wurde.

4.15.2 Ligation

Ligation ohne Ligase

Bei dieser Methode wurde das TOPO-TA Kloning Kit der Firma Invitrogen verwendet. Der eingesetzte Vektor liegt in linearisierter Form vor und besitzt einzelne 5' Thymidin (T) Überhänge, die kovalent mit der Topoisomerase I verbunden sind. Viele *Taq*-Polymerasen besitzen die Eigenschaft, ein einzelnes Desoxyadenosin (A) an die 3' Enden von PCR-Produkten zu hängen. Die Ligationseigenschaft der Topoisomerase I ligiert das PCR-Produkt mit dem Vektor anhand dieser beiden Überhänge ohne Zugabe von Ligase auf eine sehr effiziente Weise. Bei dieser Methode ist allerdings zu beachten, dass nicht alle *Taq*-Polymerasen A-Überhänge bilden.

In der Regel wurde für eine TA-Klonierung ein halber Ansatz verwendet. Für einen ganzen Ansatz werden 4 μL PCR-Produkt, 1 μL Reaktionspuffer und 1 μL TOPO-Vektor (pCR4) verwendet.

Ligation mit T4 Ligase

Die T4-DNA-Ligase kann DNA-Fragmente miteinander verbinden. Dabei wird oft ein DNA-Fragment mit einem Vektor verknüpft. Nach dem Verdau der beiden DNA-Moleküle (PCR-Produkt und Vektor) in getrennten Ansätzen werden sie in einem Ligationsansatz vereint. Die jeweiligen Enden lagern sich aneinander und die zugegebene Ligase bildet die fehlende 3'-5'-Phosphodiesterbindung aus. Die gleiche molare Menge an Vektor und Fragment wurden in einem 10 μL Ansatz mit der notwendigen Menge an Ligase-Puffer, 1 μL ATP (10 mM) und 1 μL T4-Ligase

(1 U/ μ L, Boehringer Mannheim) aufgenommen. Anschließend wurde 30 min bei RT inkubiert. Bei der Ligation von PCR-Produkten muss darauf geachtet werden, dass die Primer am 5' Ende phosphoryliert sind.

4.15.3 Generierung von short-hairpin RNA Vektoren

Idealerweise ist von einem regulierbaren Expressionssystemen eine hohe Amplitude der Induktion bei geringer oder fehlender basaler Expression sowie ein hochselektiver und nebenwirkungsfreier Induktor zu fordern. Unter diesen Gesichtspunkten ist das inzwischen gut etablierte Tetrazyklin-regulierte Expressionssystem für Säugerzellen günstig, bei dem das Antibiotikum die Genexpression reguliert.

Im verwendeten System wird die Transkription einer short-hairpin RNA (shRNA) nach Tetrazyklingabe freigegeben (Tet-on). Zur Anwendung kam das Tet-on-System der Firma Invitrogen (BLOCK-iT™). Dieses System besteht aus zwei Vektoren (Tabelle 10), die in einer Zelle vorhanden sein müssen. Der erste Vektor pcDNA6/TR exprimiert das Tetrazyklin-Repressor (TetR)-Protein, das Homodimere bildet. Im zweiten Expressionsplasmid pENTR/H1/TO steht die gegen TF-gerichtete shRNA unter Kontrolle eines H1-Promoters, in dem zwei Kopien der Tetrazyklin-Operator2 (TetO2)-Sequenz integriert sind. An eine TetO2-Sequenz bindet je ein Dimer des TetR mit hoher Affinität, sodass keine Transkription der shRNA stattfindet. Zugegebenes Tetrazyklin (1 μ g/mL) bindet in einem Verhältnis von 1:1 an den Repressor, die daraus resultierende Konformationsänderung führt zur Ablösung des TetR von der TetO2-Sequenz und die gewünschte shRNA wird exprimiert.

4.15.4 Chemische Transformation

Die chemokompetenten Zellen (3.7) wurden langsam auf Eis aufgetaut und 5-10 μ L des Ligationsansatzes wurden hinzu pipettiert. Eine Inkubation zwischen 20-30 min auf Eis folgte, und danach wurden die Zellen einem 30 sekündigem Hitzeschock bei 42°C in einem Wasserbad ausgesetzt. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen sofort auf Eis gestellt und 250 μ L SOC-Medium zugefügt. Danach folgte unter Schütteln eine Inkubation für eine Stunde bei 37°C. Nach dieser Inkubation wurde der Transformationsansatz auf eine Agarplatte mit Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nachfolgenden Tag wurden Klone hinsichtlich ihres Inserts analysiert (Kolonie-PCR, 4.5.2) und für weiterführende Experimente gelagert (4.15.5).

4.15.5 Dauerkulturen

100 μL einer Bakterienkultur (über Nacht) wurde zu einer 30%igen Glycerinlösung pipettiert und bei -80°C gelagert.

4.15.6 Plasmidisolation

Die in Bakterien durch Transfektion eingeführten Plasmide wurden repliziert und ließen sich getrennt von der genomischen *E. coli* DNA isolieren.

Isolation im Mini-Maßstab

Ein Klon wurde in 4 mL LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt (300 rpm). Die Zellen wurden bei $11.000 \times g$ für 15 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das fast trockene Pellet unter Beachtung der Herstellerangaben bis zur Plasmidsuspension aufgereinigt.

Isolation ohne Endotoxinkontamination

Von einem Klon wurde eine Vorkultur in 4 mL Medium angelegt und nach 8 h Wachstum bei 37°C folgte eine Verdünnung der Vorkultur von 1:500 in 100 mL Medium. Diese Verdünnung wurde über Nacht für etwa 16 h bei 37°C inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte wurden die Zellen bei $6.000 \times g$ und 4°C für 15 min pelletiert und der Überstand vollständig verworfen. Das Zellpellet wurde, wie vom Hersteller (PEQLAB Biotechnologie) angegeben, resuspendiert und bis zur endotoxinfreien Plasmidsuspension aufgereinigt.

4.16 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Bei der Transfektion kam das Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 der Firma Invitrogen zum Einsatz. Es ist kationisch und kann deshalb mit der negativ geladenen DNA so genannte Transfektionskomplexe bilden. Diese Komplexe lagern sich an die negativ geladene Membran von Eukaryoten an und werden durch endozytotische Vorgänge von den Zellen aufgenommen. Die Transfektion erfolgte im Medium ohne Antibiotikazusatz, da einige Transfektionsreagenzien die Zellmembran permeabilisieren. Durch die Inkubation ohne Antibiotika wird verhindert, dass die zu transfizierenden eukaryotischen Zellen die gegen Prokaryonten gerichteten Antibiotika aufnehmen und toxische Effekte erleiden. Die Medien, die zur Bildung der Transfektionskomplexe eingesetzt wurden, waren sowohl antibiotika- als auch

serumfrei. Serum hat die Eigenschaft, die Bildung von Transfektionskomplexen zu behindern.

Transfektion mit DNA

Für jeden durchgeführten Transfektionsansatz wurden am Vortag der Transfektion 10^5 Zellen in einer 12-well Platte ausgesät und mit 1 mL Wachstumsmedium (ohne Antibiotika) versetzt. Die Transfektion erfolgte wie vom Hersteller vorgeschlagen. Direkt vor der Transfektion wurde das Medium noch einmal gegen antibiotikafreies Medium ausgetauscht. Jeweils 1,6 µg DNA (in 1 x TE) und 4 µL des Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 wurden mit je 100 µL DMEM inkubiert. Nach Ablauf von 5 min bei RT wurden die beiden Ansätze vereinigt, gemischt und weitere 20 min bei RT inkubiert. Dann wurde der Ansatz auf die vorbereiteten Zellen gegeben und gleichmäßig verteilt. Die behandelten Zellen wurden anschließend bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. 4 h nach der Transfektion wurde das Medium gegen antibiotikahaltiges Wachstumsmedium ausgetauscht. Um stabile Zelllinien zu erhalten, wurden die transfizierten Zellen 24 h nach Transfektion mit unterschiedlichen Selektions-antibiotika kultiviert (Tabelle 10).

Tabelle 10. Verwendete Selektionsantibiotika zum Generieren von stabil transfizierten Zelllinien.

Plasmid	Selektionsantibiotikum
pcDNA3.1 (-)	Gentamycin® (G418) 800 µg/mL
pENTR/H1/TO	Zeozin™ 400 µg/mL
pcDNA6/TR	Blastizidin S 20 µg/mL

Ko-Transfektionsversuche wurden ebenfalls mit obengenannten Lipofectamin 2000 durchgeführt. Dadurch konnte die Effizienz der generierten shRNA-Plasmide gegen murinen TF validiert werden. Dazu wurden COS-7 Zellen mit dem TF-GFP-Fusionsplasmid (eGFP-N1-TF) mit oder ohne den shRNA-Plasmiden (530 oder 780) doppelt transfiziert. Die Effizienz der shRNAs wurde im Durchflusszytometer 24 h nach Transfektion bestimmt. Der Schwellenwert für einen erfolgreichen Gen *knock down* wurde auf 30% der Kontrollen gesetzt (Abbildung 11).

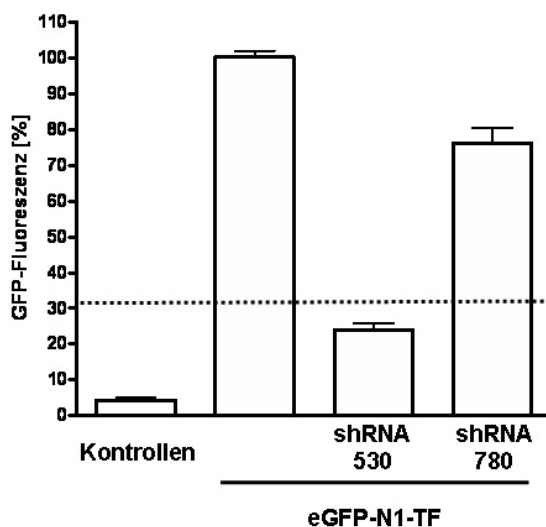


Abbildung 11. Überprüfen der shRNA-Effizienz durch ko-Transfektionsexperimente mit einem eGFP-N1-TF-Fusionsprotein. Die Effizienz der designten shRNA gegen TF der Maus wurde anhand eines Fusionsproteins aus TF und GFP mittels eGFP-N1-Vektor in COS-7 Zellen überprüft. Die Zellen wurden mittels Lipofectamin 2000 mit dem Expressionsvektor für TF-GFP und dem jeweiligen shRNA-Expressionsvektor ko-transfiziert. Die Expression vom GFP Fusionsprotein wurde mittels Durchflusszytometrie (ein Tag nach Transfektion) bestimmt. Die Fluoreszenzwerte der Transfektion nur mit eGFP-N1-TF wurde 100% gesetzt und alle anderen Ko-Transfektionsergebnisse darauf bezogen (gestrichelte Linie = Schwellenwert (30% GFP-Fluoreszenz der eGFP-N1-TF-Einzeltransfektion) bei der die Funktionalität der shRNA angenommen wurde).

4.17 Angewandte Programme und statistische Auswertung

Beim Vergleich von homologen Sequenzen kam das Programm AlignIR (Corpet, 1988) zur Anwendung. Mit dem BLAST Programm (Altschul et al., 1990) wurden zu analysierende Sequenzen mit den im Internet veröffentlichten ähnlichen oder gleichen Sequenzen verglichen.

Zum Auswerten der TaqMan® Daten kam das SDS Programm Version 2.2.2 der Firma Applied Biosystem zum Einsatz.

Alle Daten sind, soweit nicht anders gekennzeichnet, als arithmetische Mittelwerte und Standardfehler dargestellt und entstammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Zur Prüfung, ob zwischen den Mittelwerten signifikante Unterschiede vorlagen, wurden bei normalverteilten Daten ungepaarte t-Tests durchgeführt. In den Experimenten, die mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, wurden Einweg-ANOVA-Tests mit anschließender Bonferroni-Korrektur verwendet.

Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit Programmen SPSS Version 15.0.1 (SPSS Software Inc., Chicago, IL, USA) und GraphPad Prism Version 4.0.3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Für alle Ergebnisse wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ als minimales Signifikanzniveau angenommen.

5 Ergebnisse

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse stammen aus *in vivo*- und *in vitro*-Versuchen und lassen sich in vier Teile gliedern.

Der erste Teil beinhaltet Untersuchungen an einem etablierten durch Virusinfektion induzierten MC-Modell der Maus.

Der zweite Teil behandelt eine Studie an Myokardbiopsien von Patienten mit vermuteter akuter MC/ inflammatorischer CM, bei der der mögliche Zusammenhang der TF-Expression mit anderen krankheitsrelevanten Parametern untersucht wurde.

Im dritten Abschnitt der Arbeit sind die Ergebnisse der Experimente zur transkriptionellen Regulation der TF-Expression in Kardiomyozyten aufgeführt. Dabei wurden nicht nur die transkriptionellen Regulationswege sondern auch der Einfluss der Kardiomyozyten auf die Thrombogenität des Myokards während der myokardialen Entzündungsreaktion untersucht. Die Daten wurden an einer gut beschriebenen murinen Kardiomyozytenzelllinie (HL-1) *in vitro* und an primären Mauskardiomyozyten *ex vivo* erhoben.

Im letzten Teil wurden die Effekte einer kardiomyozytären TF-Überexpression hinsichtlich des Wachstums- und des Zytokin-induzierten Apoptoseverhaltens an den oben genannten kardiomyozytären Zellen *in vitro* untersucht.

5.1 Das Mausmodell der CVB3-induzierten Myokarditis

Durch eine i.p. Infektion mit dem kardiotropen Coxsackie Virus B3 (CVB3) wurde bei ABY/SnJ (H-2^b) Mäusen eine myokardiale Entzündung induziert, die als Modellsystem der humanen MC und inflammatorischen CM angesehen wird.

5.1.1 Der immunhistologische Nachweis von Fibrin und Infiltraten im Myokard

Als Marker für eine Aktivierung der Koagulationskaskade gelten Fibrinablagerungen. Die CVB3-Infektion der Mäuse führte zu einem immunhistologisch nachgewiesenen Anstieg der Fibrinablagerungen im Myokard und dies innerhalb der ersten vier Tage nach Virusinfektion (p.i.) (Abbildung 12). An Tag 8 p.i. waren die Muster der Fibrinablagerungen vergleichbar mit dem Muster der zellulären Infiltrationen. 28 Tage p.i. konnte noch immer Fibrin im Herzgewebe und ventrikuläre Thrombusformationen beobachtet werden (Abbildung 12).

Ergebnisse

Eingewanderte Lymphozyten ($CD3^+$) und Makrophagen ($MAC3^+$) waren an Tag 4 p.i. besonders in direkter Gefäßnähe im Herzen nachweisbar. Die myokardiale Entzündung erreichte ihren Höhepunkt 8 Tage p.i.. Selbst in der chronischen Phase des untersuchten MC-Modells (28 Tage p.i.) waren Infiltrate im infizierten Myokard sichtbar (Abbildung 12).

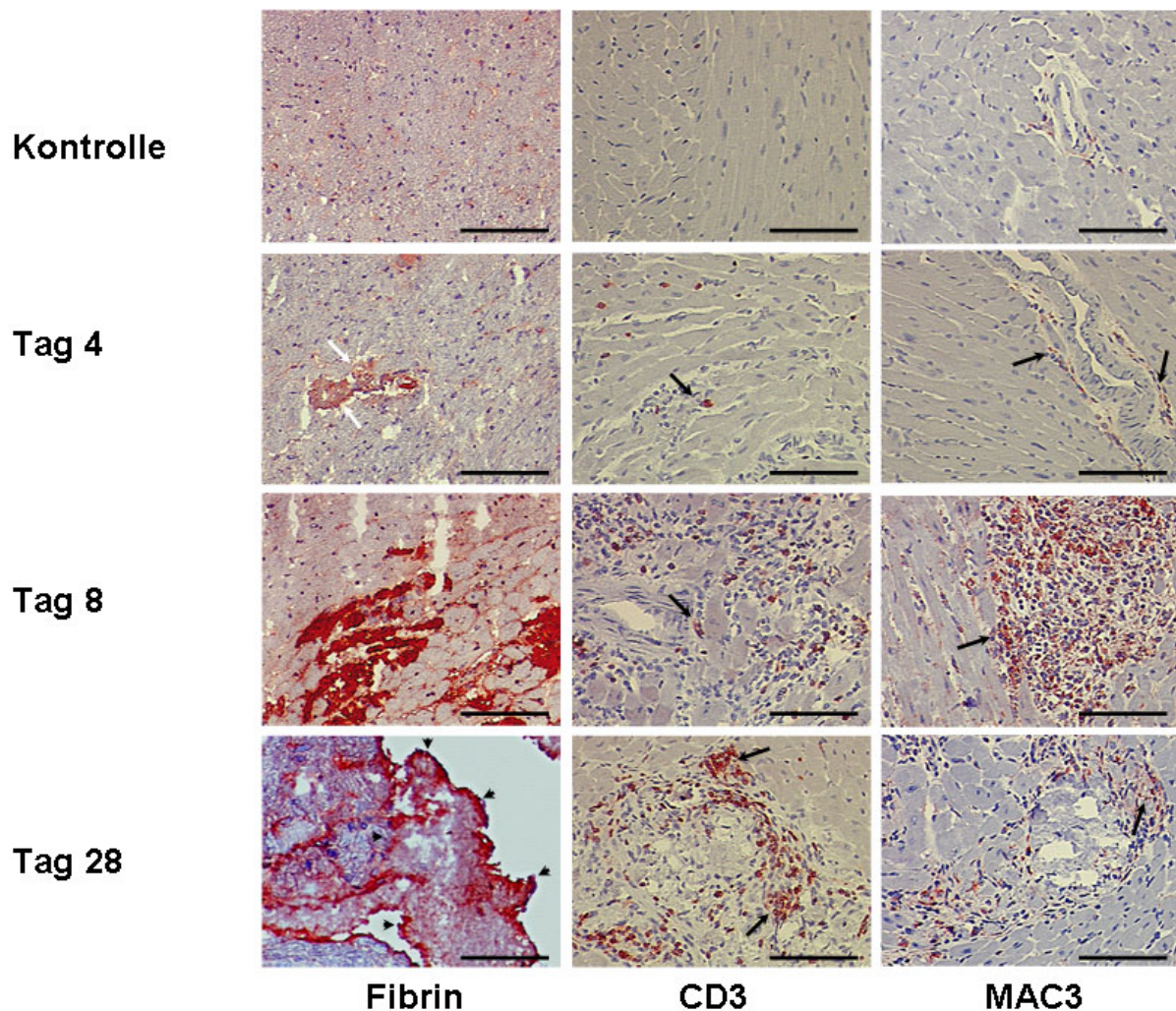


Abbildung 12. Immunhistochemische Färbungen an myokardialem Gewebe für Fibrin, $CD3^+$ -T-Lymphozyten und $MAC3^+$ -positive Zellen (Makrophagen) im Verlauf einer CVB3-induzierten Myokarditis (MC). Myokardschnitte der mit CVB3 infizierten Mäuse wurden mit gegen Fibrin, CD3 und MAC3 gerichtete Antikörper im zeitlichen Verlauf einer MC gefärbt. Am Tag 4 p.i. (weiße Pfeile) sind die Signale für Fibrin innerhalb der Blutgefäße und perivaskulär schwach sichtbar und werden deutlicher am Tag 8 p.i.. An Tag 28 p.i. zeigten sich ventrikuläre Thromben (Pfeilköpfe). Fokale Infiltrationen aus T-Lymphozyten ($CD3^+$) und Makrophagen ($MAC3^+$) waren ab Tag 8 p.i. nachweisbar (Pfeile). Die Infiltrationsmuster schwächten sich am Tag 28 p.i. ab. In den nicht infizierten Kontrollherzen zeigten sich keine signifikanten Signale weder für Fibrin noch für CD3 oder MAC3 (Balken = 100 μ m).

5.1.2 Die Veränderung der hämodynamische Parameter infolge einer CVB3-Infektion

Im untersuchten CVB3-MC-Modell kam es zu einer signifikanten Verschlechterung der myokardialen Pumpfunktion an den ersten beiden Untersuchungszeitpunkten (Tag 4 und 8 p.i.). Die gemessenen Druckparameter und die Ejektionsfraktion der infizierten Herzen waren zu oben genannten Zeitpunkten gegenüber denen der Kontrolltiere signifikant verschlechtert (Tabelle 11). Ferner unterschieden sich bei den verwendeten ABY/SnJ (H-2^b) Mäusen unterschieden sich die enddiastolischen Volumen der Herzen im zeitlichen Verlauf nicht signifikant. Im Gegensatz zu dem hämodynamischen Verlauf wurden die vermehrten Fibrinablagerungen erst nach Tag 8 p.i. nachgewiesen (Abbildung 12). Demzufolge trat die Aktivierung des Gerinnungssystems, gemessen an der vermehrten Fibrinablagerungen, unabhängig von der kardialen Dysfunktion und der Vergrößerung des linken Ventrikels auf (Tabelle 11).

Tabelle 11. *In vivo*-Messung der Herzfunktion in Abhängigkeit zur CVB3-Infektion im zeitlichen Verlauf.

	Kontrollen	Tag 4 p.i.	Tag 8 p.i.	Tag 28 p.i.
LVP (mmHg)	71 ± 3	58 ± 1*	70 ± 5	64 ± 5
dp/dtmax (mmHg/s)	5497 ± 445	2679 ± 447*	2974 ± 183*	3793 ± 517
dp/dtmin (mmHg/s)	2810 ± 291	1670 ± 417*	1982 ± 95	2108 ± 304
HR (min ⁻¹)	393 ± 21	288 ± 20*	243 ± 40*	292 ± 13*
CO (mL/min)	2,0 ± 0,17	0,7 ± 0,09*	0,5 ± 0,16*	1,4 ± 0,23
EDV (µL)	68 ± 3	54 ± 5	50 ± 5	59 ± 8
ESV (µL)	17 ± 2	32 ± 7	20 ± 2	16 ± 3
EF (%)	75 ± 2	52 ± 8*	43 ± 10*	80 ± 5

* P<0,05 vs. Kontrollen (N>4)

(CO: Auswurfvolumen; EF: Ejektionsfraktion; EDV: Enddiastolisches Volumen; ESV: Endsystolisches Volumen; HR: Herzschläge; LVP: Linksventrikulärer Druck)

5.1.3 Die Veränderung der myokardialen Tissue Factor-Expression in Relation zur myokardialen Entzündungsreaktion

Die Infektion mit 10^5 pfu CVB3 führte zu einem signifikanten Anstieg der myokardialen TF-Proteinexpression ab dem achten Tag der Erkrankung (Abbildung 13). Die durch Western Blot Densitometrie quantifizierten Daten zeigten während der akuten Phase (8 Tage p.i.) der viralen Infektion einen $5,32 \pm 0,81$ -fachen Anstieg des myokardialen TF-Proteins ($P < 0,001$ vs. Kontrollen, Abbildung 13). In der chronischen Phase (28 Tage p.i.) war der myokardiale TF-Proteingehalt noch immer um das $3,19 \pm 0,32$ -fache erhöht ($P < 0,01$ vs. Kontrollen, Abbildung 13).

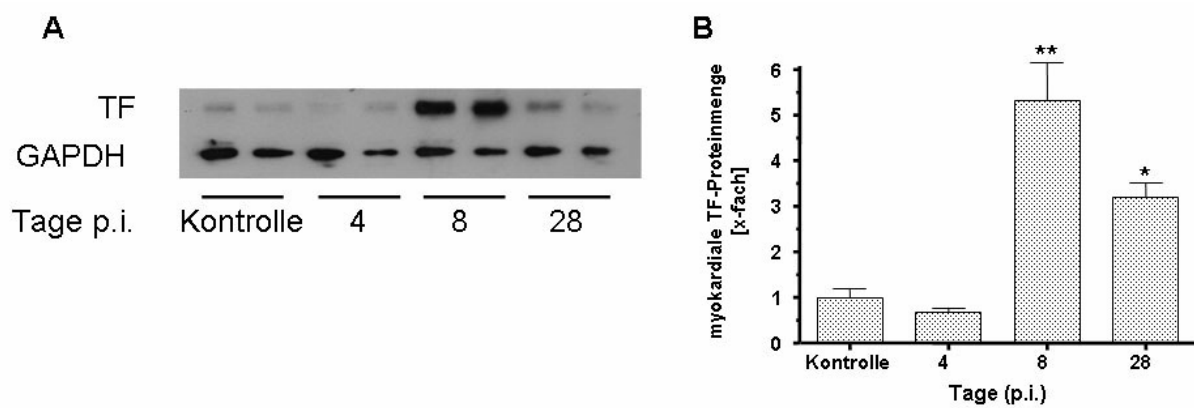


Abbildung 13. Tissue Factor-Proteinexpression in CVB3-infizierten Herzen. A.) Repräsentativer Western Blot für TF und GAPDH mit aus CVB3-infizierten Herzlysaten isolierten Protein. **B.)** Veränderungen der TF-Proteinexpression mittels Densitometrie quantifiziert. Die Proteinexpression der nicht infizierten Kontrollen wurden auf eins normiert (* $P < 0,01$; ** $P < 0,001$ vs. nicht infizierten Kontrollen, $N > 6$).

Ergebnisse

Die Messung der myokardialen TF-mRNA-Expression zeigte einen gegenläufigen Trend verglichen mit den TF-Proteindaten. An Tag 4 p.i. kam es zu einer signifikanten Steigerung der TF-Genaktivität und damit zu einem erhöhten TF-mRNA-Spiegel (Abbildung 14). Im späteren Verlauf der MC sank der TF-mRNA-Spiegel auf etwa 66% des Kontrollniveaus (Abbildung 14). Die mRNA-Daten lassen auf einen negativen Regulationsmechanismus der TF-Genaktivität schließen.

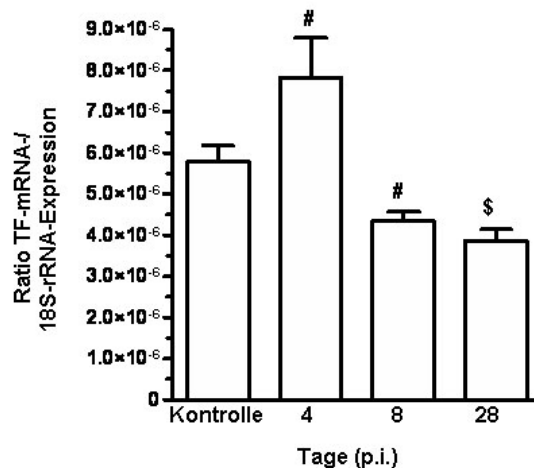


Abbildung 14. Veränderungen der Tissue Factor-mRNA-Expression im Verlauf der viralen Myokarditis. Die TF-Genexpression wurde mittels LowDensity Array Technik (4.7.3) ermittelt und auf die 18S-rRNA-Expression bezogen (# P<0,05; \$ P<0,005 vs. Kontrolle; N>6).

Im Gegensatz zur TF-Expression veränderte sich die Tissue Factor Pathway Inhibitor-1 (TFPI-1) Proteinexpression im Verlauf der Erkrankung nicht (Abbildung 15). In Anbetracht der gesteigerten TF-Expression und unveränderten TFPI-1-Expression im Herzen lässt dies auf ein erhöhtes kardiales Thromboserisiko während der viralen MC schließen.

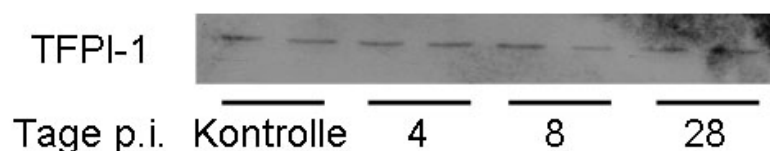


Abbildung 15. Tissue Factor Pathway Inhibitor-1-Expression im Herzen im Verlauf einer CVB3-Infektion. Mäuse wurden mit CVB3 infiziert und die myokardiale TFPI-1-Proteinexpression an verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Die Abbildung zeigt den Western Blot für TFPI entsprechend der Abbildung 13.

Ergebnisse

Bei immunhistologischen Färbungen der infizierten Herzen immunhistochemischen Färbungen anhand TF-spezifischer Antikörper wurde bestätigt, dass die TF-Expression im Krankheitsverlauf innerhalb des Herzmuskels anstieg. Im verwendeten Tiermodell wurden innerhalb des Endokards verstärkte Signale für TF ab Tag 4 p.i. beobachtet (Abbildung 16). Die TF-Expression war nach CVB3-Infektion außerdem im gesamten Myokard erhöht. Dies zeigte sich besonders jedoch in der Nähe zu zellulären Infiltrate, wie in Abbildung 16 C+D dargestellt.

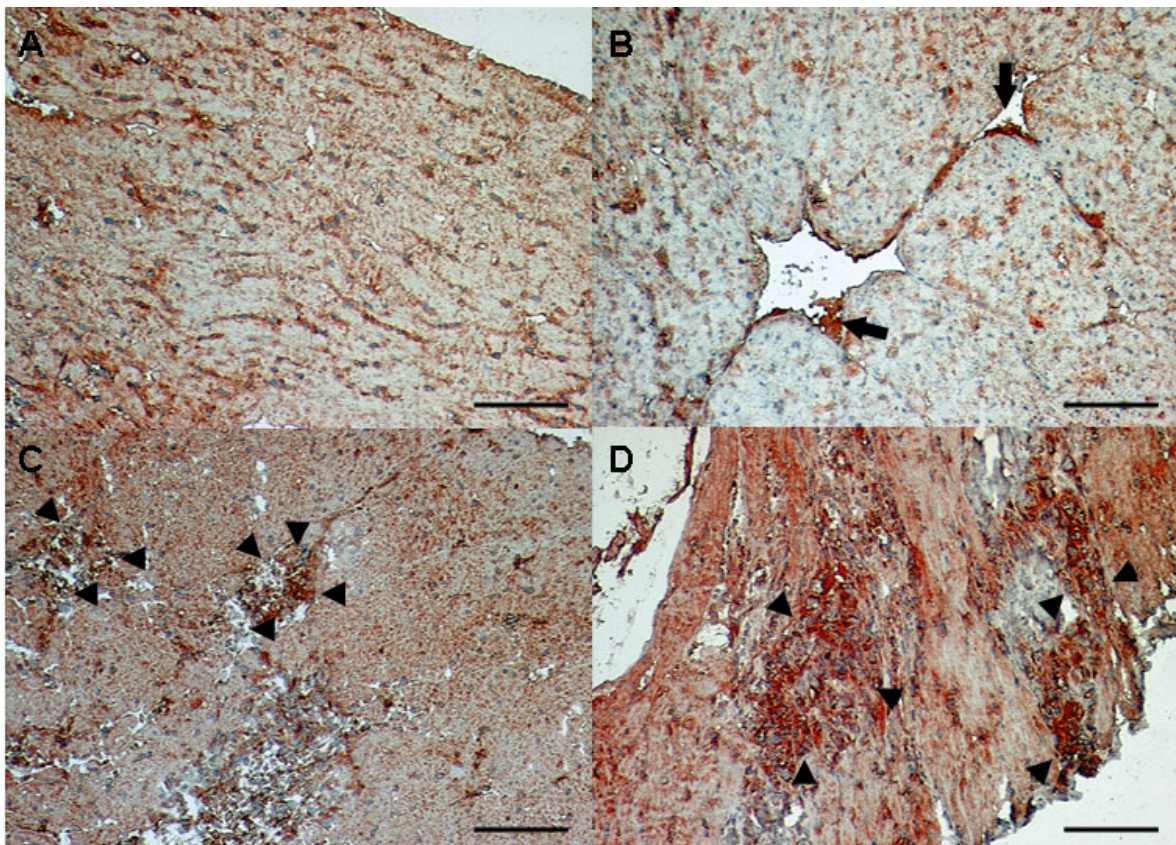


Abbildung 16. Lokalisierung von Tissue Factor im Myokard während einer viralen Myokarditis (MC). Immunhistologie **A.)** TF war konstitutiv innerhalb des Myokards bei gesunden Kontrollen exprimiert. **B.)** 4 Tage p.i. stellten sich verstärkte Signale für TF im Bereich der Gefäßwände dar (Pfeile). Die myokardiale TF-Expression stieg im weiteren Krankheitsverlauf an und war immunhistologisch besonders in der Nähe von zellulären Infiltrationen (Pfeilspitzen) an Tag 8 **(C)** und Tag 28 p.i. **(D)** erkennbar (Balken = 100 µm).

Ergebnisse

Positive Korrelationen bestanden zwischen der myokardialen TF-Proteinexpression und den quantifizierten in Myokard infiltrierten CD3⁺- und MAC3⁺-Zellen (Spearman's-Rho $\rho=0,749$; $P<0,0001$ für CD3⁺ sowie $\rho=0,775$; $P<0,0001$ für MAC3⁺; N=35). Weiterhin korrelierte die TF-Proteinmenge positiv mit den im Myokard nachgewiesenen inflammatorischen Zytokinen TNF- α und IL-1 β ($\rho=0,629$; $P<0,0001$ für TNF- α und $\rho=0,584$; $P<0,0001$ für IL-1 β ; N=36). Ferner war der Grad der kardialen TNF- α - und IL-1 β -Expression positiv mit der Anzahl der infiltrierten Zellen korreliert (TNF- α : $\rho=0,700$; $P<0,0001$ mit CD3⁺; $\rho=0,799$; $P<0,0001$ mit MAC3⁺; N=34 und IL-1 β : $\rho=0,646$; $P<0,0001$ mit CD3⁺; $\rho=0,722$; $P<0,0001$ mit MAC3⁺; N=34). Die Daten lassen vermuten, dass die Induktion der TF-Genexpression durch pro-inflammatorische Zytokine (Abbildung 17) und die Anwesenheit von Immunzellen (Abbildung 12) im kardialen Muskel vermittelt wird.

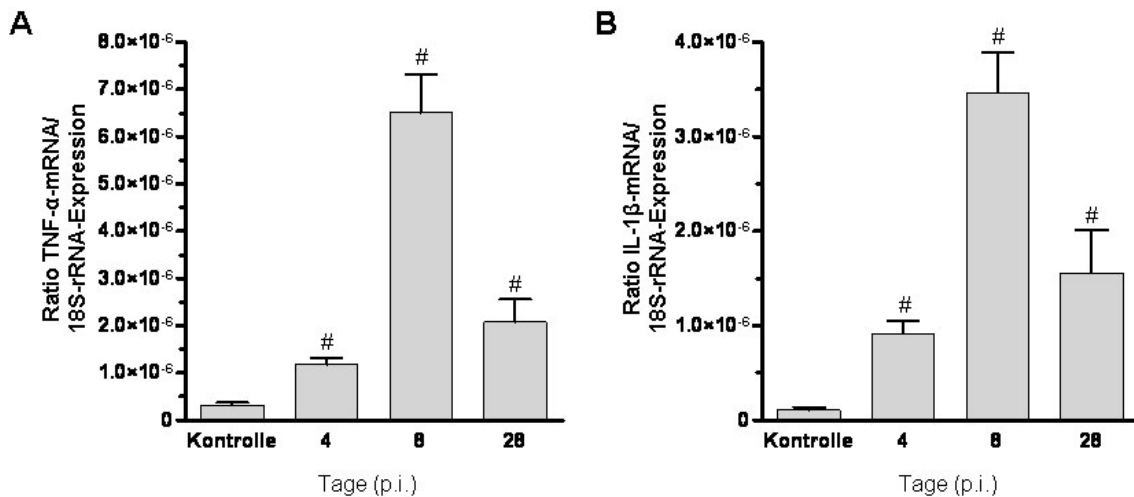


Abbildung 17. Myokardiale Expression der inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β im Verlauf der CVB3-induzierten Myokarditis (MC). Die myokardiale mRNA-Expression wurde im zeitlichen Verlauf einer MC bestimmt. Die gemessene Genexpression von TNF- α (A) und IL-1 β (B) wurde auf 18S rRNA-Expression bezogen (# $P<0,05$ vs. Kontrollen, N>6).

Die zelluläre TF-Expression wird bei verschiedenen Zelltypen mit dem zellulären Überleben in Zusammenhang gebracht. In den untersuchten Herzen korrelierte die TF-Expression mit der Expression der anti-apoptotischen Proteine AKT-1 ($\rho=0,630$; $P<0,0001$; N=36) und AKT-2 ($\rho=0,382$; $P<0,05$; N=36).

5.1.4 *In situ*-Nachweis von aktivierten Tissue Factor

Gewebeschnitte von infizierten und gesunden Mausherzen wurden mit biotinyliertem FVIIa inkubiert, um aktiven oder thrombogenen TF nachzuweisen. Ein Anstieg der Signalintensität (grün) war ab Tag 8 p.i. sichtbar (Abbildung 18 B). Die FVIIa-Bindung an TF war in der Nähe von Infiltraten fokal verstärkt (Abbildung 18 B+C). Bei den Kontrollen ergab sich ein nur schwach grünes Signal (Abbildung 18 D).

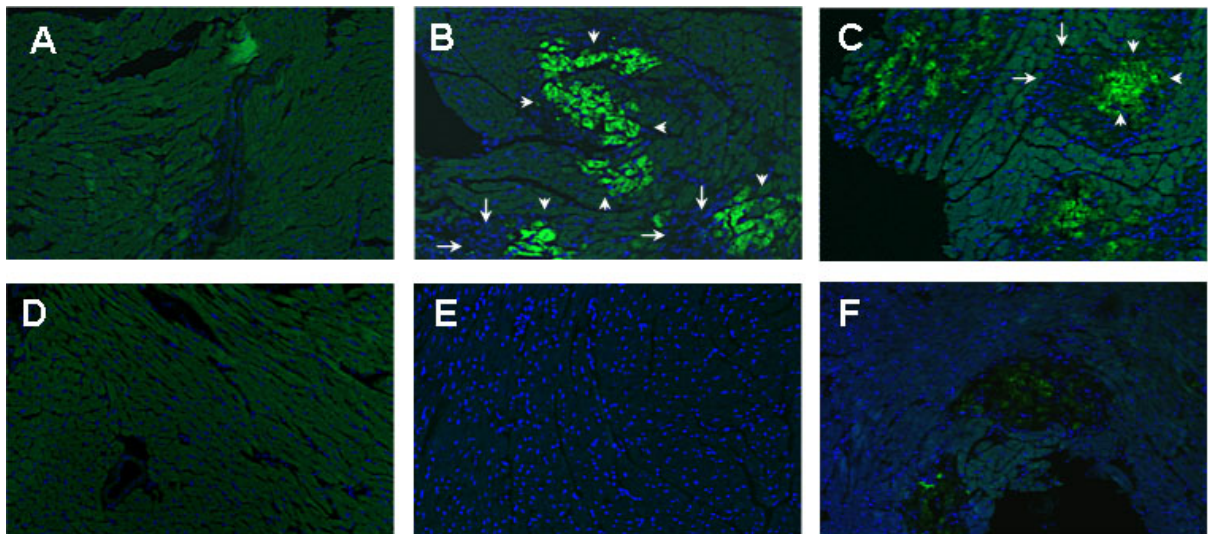


Abbildung 18. *In situ*-Nachweis von thrombogenem Tissue Factor mittels Immunfluoreszenz an Schnitten von mit CVB3-infizierten Herzen. CVB3-infizierte Herzen wurden mit rekombinantem FVIIa inkubiert, um die von thrombogenem TF-vermittelte FVIIa-Bindung nachzuweisen (MFP488, grün). **A.)** An Tag 4 p.i. ist keine TF-Aktivierung nachweisbar. Das Muster der FVIIa-Bindung (Pfeilspitzen) war vergleichbar mit den Infiltrationszonen (Pfeile) innerhalb des infizierten Myokards, acht Tage **(B)** und 28 Tage **(C)** nach Infektion. **D.)** Nicht infizierte Kontrollen zeigten nur eine schwache Grünfärbung. Kontrollfärbungen mit nicht biotinyliertem FVIIa an Kontrollherzen **(E)** und eine Vorbehandlung mit nicht biotinyliertem FVIIa **(F)** vor der Inkubation mit biotinyliertem FVIIa an infizierten Herzen (Tag 8 p.i.) ergaben nur schwache Färbungen. Die Zellkerne (blau) wurden durch eine Gegenfärbung mit TO-PRO 3 sichtbar gemacht (Originalvergrößerung 100x).

Ergebnisse

Vergleichbare Ergebnisse innerhalb des Myokards zeigten sich, bei Vergleich der Fluoreszenzfärbungen mit parallel durchgeführten immunhistologischen Färbungen (Abbildung 19). Ferner ließen sich bei den Kardiomyozyten Anzeichen von Disintegration und Defragmentation in apoptotische Körperchen, wie in Abbildung 19 C+D zu sehen ist, beobachten.

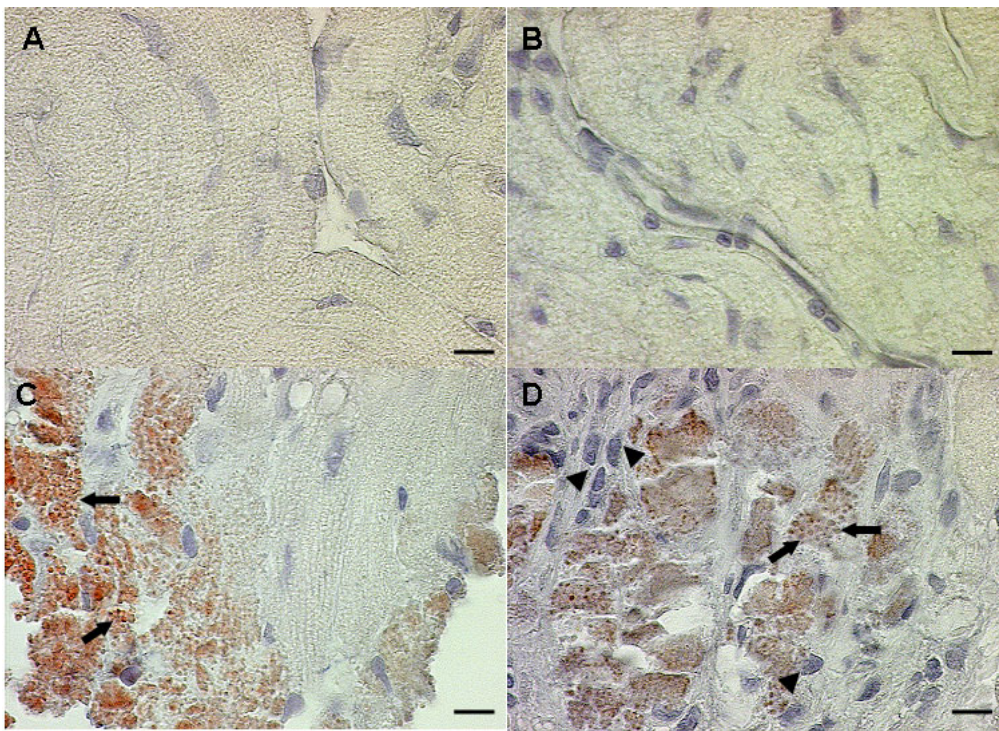


Abbildung 19. Nachweis der *in situ*-FVIIa-Bindung mittels Immunhistochemie an Schnitten von mit CVB3-infizierten Herzen. CVB3-infizierte Herzen wurden mit rekombinantem biotinyliertem FVIIa inkubiert, um prokoagulanten TF durch dessen FVIIa-Bindung nachzuweisen. **A.)** Es wurde keine TF-Aktivierung in den Kontrollherzen nachgewiesen. **B.)** Eine FVIIa-Bindung im Myokard war ebenfalls nicht detektierbar an Tag 4 p.i. **C.)** Ab Tag 8 p.i. gab es starke Signale für gebundenen FVIIa. Diese Beobachtung war mit strukturellen Veränderungen wie kardiomyozytäre Disintegration, Defragmentation und Bildung von apoptotischen Körperchen (Pfeile) innerhalb des infizierten Myokards verbunden. **D.)** 28 Tage p.i. zeigte sich immer noch aktivierter TF, welcher in direkter Nähe zu den Infiltraten (Pfeilspitzen) und apoptotischen Körperchen (Pfeile) zu lokalisieren war (Balken = 10 μ m).

Ergebnisse

Im zweiten Schritt wurden die Herzgewebe gleichzeitig für aktiven TF (grün) und entweder *vascular cellular adhesion molecule-1* (VCAM-1; Abbildung 20 A-D) oder CD3 (Abbildung 20 E-H) gefärbt und die genannten Antigene durch eine Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen. VCAM-1 (rot) war ab Tag 4 bis Tag 28 p.i. verstärkt im Endothel der infizierten Herzen nachweisbar (Abbildung 20 B-D). Die Färbung für CD3 (blau) und aktiven TF (grün) in Abbildung 20 (E-H) bestätigte die Ko-Lokalisation von aktivierten TF mit infiltrierenden Lymphozyten (weiße Pfeilspitzen). Die Interaktion von FVIIa mit TF lässt auf eine gesteigerte Thrombogenität des entzündeten Herzmuskels, besonders in Nähe der infiltrierenden Leukozyten, schließen.

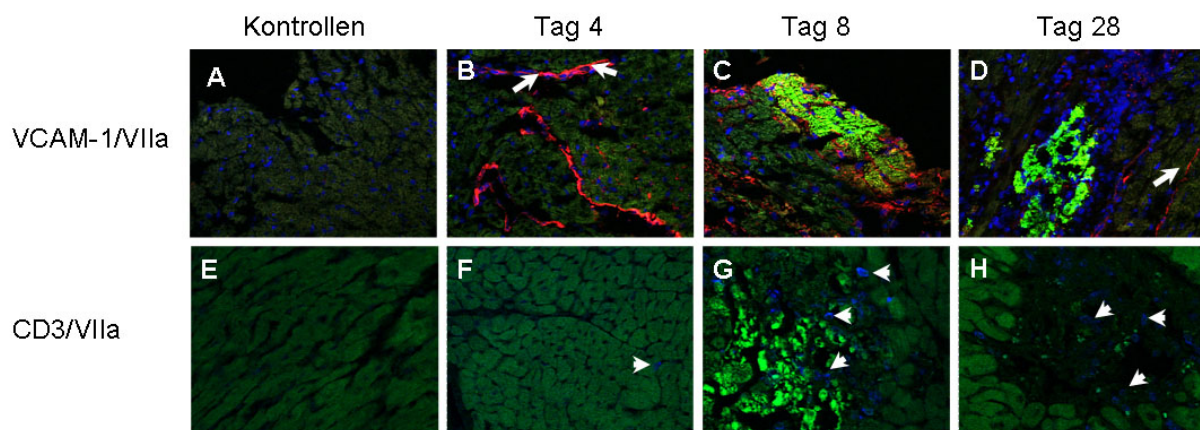


Abbildung 20. Immunfluoreszenznachweis der Ko-Lokalisation von VCAM-1 und CD3⁺-Zellen mit aktivierten Tissue Factor. CVB3-infizierte Herzen wurden mit spezifischen Antikörper gegen VCAM-1 (Cy3, rot) und für aktiven TF (FVIIa-Bindung, MFP488 grün) gefärbt. Eine virale Infektion ist mit einer gesteigerten VCAM-1-Expression der Gefäße (**B-D**, weiße Pfeile) innerhalb des Myokards verbunden. Eine Ko-Lokalisation von VCAM-1 und FVIIa (gelb) war in der akuten und chronischen Phase der Myokarditis (MC) sichtbar (**C-D**). In der akuten Phase der MC deutet die Bindung von FVIIa und die Ko-Lokalisation mit CD3⁺-Lymphozyten (Cy5, blau, **E-H**, weiße Pfeilspitzen) auf eine Aktivierung von TF in besonders in der Nähe der Infiltrate hin. In den Kontrollschnitten waren weder Signale für VCAM-1 (**A**) noch für CD3 (**E**) nachweisbar. Die Zellkerne (blau) wurden bei den VCAM-1 Färbungen mit TO-PRO 3 (**A-D**) sichtbar gemacht (Originalvergrößerung 200x).

5.1.5 Die Thrombogenität des Blutes im Verlauf der Myokarditis

Zitratplasma wurde von infizierten Mäusen zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen und die TF-Aktivität mittels eines chromogenen FXa-Generationsassays bestimmt. Die TF-Aktivität im Plasma war an den Tagen 4 und 8 p.i. um etwa das Zweifache verglichen mit den Kontrollen erhöht (Abbildung 21). Dies lässt auf eine gesteigerte systemische Prokoagulabilität während der viralen Entzündungsreaktion des Herzens schließen. In der chronischen Phase der CVB3-Infektion sank die gemessene TF-Aktivität im Plasma auf das Niveau der Kontrollen.

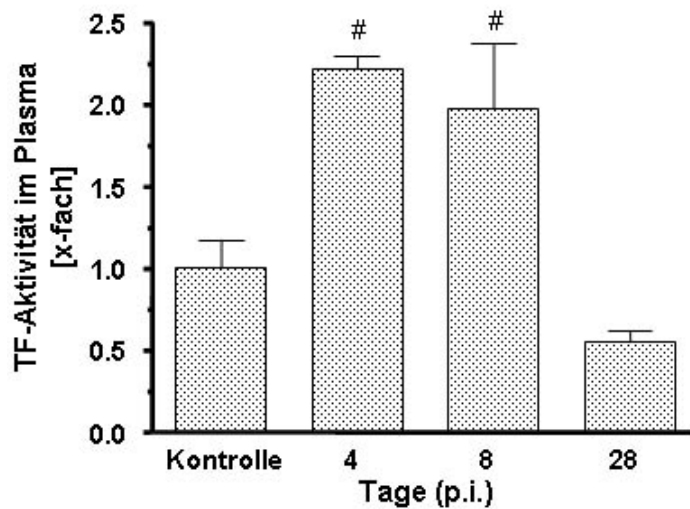


Abbildung 21. Plasma Tissue Factor-Aktivität im Verlauf der CVB3-Infektion. Plasmen von infizierten Mäusen weisen eine erhöhte TF-Aktivität an Tag 4 p.i. auf. Die TF-Aktivität war bis Tag 8 p.i. erhöht und sank am Tag 28 p.i. auf das Niveau der Kontrollen. Die TF-Aktivität im Plasma der Kontrolltiere wurde auf eins normiert (# $P < 0,05$ vs. Kontrollen; $N = 4-6$).

5.2 Die Tissue Factor-Expression im Herzen bei Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie

5.2.1 Charakterisierung der Patientenkollektive

Die untersuchten Patientenkollektive bestanden aus Patienten mit vermuteter akuter MC bzw. inflammatorischer CM (N=54) und einer Vergleichsgruppe (N=14). Die Krankheitssymptome der Patienten sind in Tabelle 12 angegeben. Alle Patienten mit vermuteter MC bzw. inflammatorischer CM erkrankten innerhalb der letzten 6 Wochen an einer viralen Infektion. Die Charakterisierung der Patientenkollektive ergab keinen signifikanten Unterschied in der Altersstruktur, der Geschlechtsverteilung und der gemessenen Herzfunktionsparametern. Die Pumpfunktion der Herzen der untersuchten Patienten war mit einer EF von $57,3 \pm 2,6\%$ nur geringgradig eingeschränkt (Tabelle 12). Zwischen den untersuchten Gruppen gab es bezüglich des Auftretens von Beschwerden, wie atypischer *Angina pectoris* und Palpitationen, einen signifikanten Unterschied (Tabelle 12).

Tabelle 12. Klinische Charakterisierung der untersuchten Patientenkollektive.

	Vermutete Myokarditis bzw. inflammatorische Kardiomyopathie (N=54)	Kontrollen (N=14)
Alter (Jahre)	38,9 ± 1,7	39,9 ± 4,5
Geschlecht (m/w)	40/14	5/9
Symptome:		
Virusinfektion < 6 Wochen	54 (100%)**	0 (0%)
Dyspnoe (unter Belastung)	23 (43%)	9 (64%)
<i>Angina pectoris</i> (atypische)	38 (70%)*	2 (14%)
Palpitation	11 (20%)*	7 (50%)
Herzfunktionsparameter:		
EF (%)	57,3 ± 2,6	62,2 ± 5,1
LVEDD (mm)	52,5 ± 1,3	52,0 ± 2,1

* P<0,01 vs. Kontrollen; ** P<0,0001 vs. Kontrollen

(EF: Ejektionsfraktion; LVEDD: Linksventrikulärer Enddiastolischer Diameter)

5.2.2 Die Tissue Factor-Expression und der Nachweis der myokardialen Entzündungsreaktion im untersuchten Patientenkollektiv

In dem Patientenkollektiv mit der vermuteten akuten MC bzw. inflammatorischen CM wurde bei 31 von 54 Fällen (58%) eine positive myokardiale Entzündungsreaktion nachgewiesen werden (Abbildung 22). Für eine positive myokardiale Entzündungsreaktion mussten mehr als sieben CD3⁺-Zellen pro mm² anhand von immunhistochemischen Färbungen von Myokardschnitten nachgewiesen werden. Lagen nur grenzwertig erhöhte zelluläre Infiltrationen (4-7 CD3⁺-Zellen pro mm²) vor, so waren des Weiteren noch mindestens zwei der zellulären Adhäsionsmoleküle immunhistochemisch bei den spezifischen Myokardfärbungen vermehrt exprimiert (Noutsias et al., 1999).

Ferner boten 38 Patienten (70%) virales Genom im Myokard. Bei 20 Patienten (37%) waren sowohl eine akute Entzündungsreaktion als auch Virusgenome im Myokard nachzuweisen. Nur bei 9% der Patienten (N=5) konnten weder eine Virusinfektion des Myokards noch eine myokardiale Entzündung beobachtet werden (Abbildung 22).

In den Herzgeweben der Kontrollen (N=14) zeigten sich keine Entzündungsreaktionen und es waren keine virale Genome nachweisbar.

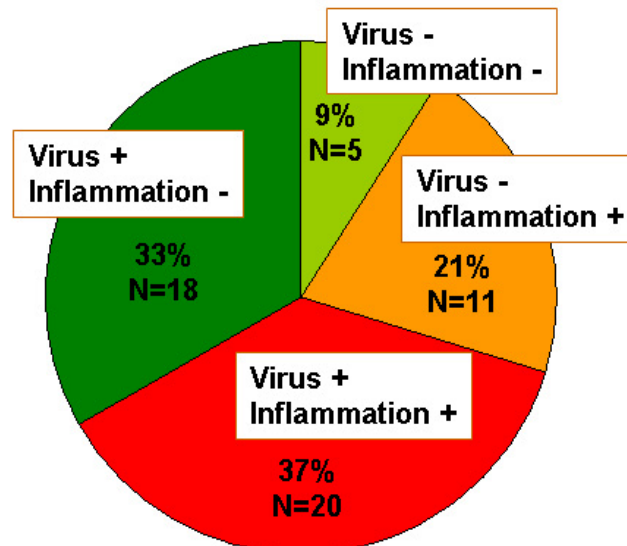


Abbildung 22. Unterteilung des Patientenkollektives mit vermuteter Myokarditis bzw. inflammatorischer Kardiomyopathie hinsichtlich des Viruspersistenz und/oder myokardialer Entzündungsreaktion. Die myokardiale Entzündungsreaktion wurde anhand von histologischen Färbungen für CD3⁺-Zellen und zelluläre Adhäsionsmoleküle an myokardialen Biopsien analysiert (Noutsias et al., 1999). Der Nachweis der viralen Genome erfolgte an einer separaten Biopsie mittels *nested* PCR (Kuhl et al., 2003) (100% N=54).

Ergebnisse

Endomyokardbiopsien (EBM) von Patienten mit vermuteter MC/ inflammatorischer CM wurden alle hinsichtlich ihrer TF-Expression untersucht. Die TF-mRNA-Expression (Abbildung 23) war in den EMBs von Patienten mit vermuteter MC bzw. inflammatorischer CM ($2,374 \pm 0,123$; N=54), verglichen mit den Kontrollen ($3,567 \pm 0,206$; N=14; $P < 0,0001$), signifikant reduziert. Diese Daten bestätigen die Ergebnisse aus Abschnitt 5.1.3 des CVB3-Tierversuchs. Dort wurden ebenfalls verminderte TF-mRNA-Spiegel bei Tieren mit länger anhaltender myokardialen Inflammation beobachtet (Abbildung 14).

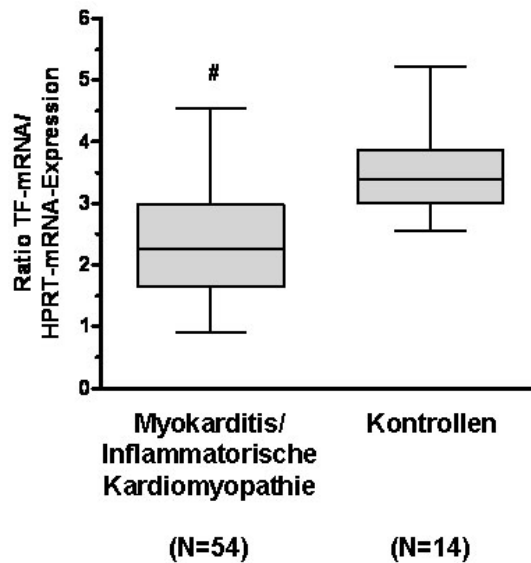


Abbildung 23. TF-Expression im Myokard von Patienten mit vermuteter Myokarditis (MC) bzw. inflammatorischer Kardiomyopathie (CM). Es wurden Endomyokardbiopsien von Patienten mit MC bzw. inflammatorischer CM (N=54) und den Kontrollen (N=14) entnommen und mittels der in 4.7 beschriebenen Methode hinsichtlich der TF-Genexpression untersucht. Gezeigt ist die TF-Genexpression bezogen auf die Expression von HPRT (# $P < 0,0001$ vs. Kontrollen).

5.2.3 Die myokardiale Tissue Factor-Expression in Abhängigkeit zur Virusinfektion

Ob die myokardiale TF-Expression sich in Abhängigkeit vom Vorhandensein viralen Genoms im humanen Herzen ändert, ist unbekannt.

Wie in Abbildung 24 gezeigt stellte sich kein Zusammenhang zwischen der TF-Expression und dem Vorhandensein von viralem Genom im Herzen von Patienten mit vermuteter akuter MC bzw. inflammatorischer CM dar (TF-Expression: $2,306 \pm 0,215$ vs. $2,402 \pm 0,152$; $P=n.s.$; negativer vs. positiver Virusnachweis). Ein positiver Nachweis von Parvovirus B19 (PVB19) gelang bei 33 von 38 Patienten (87%). Somit war PVB19 das am häufigsten vertretene Virus.

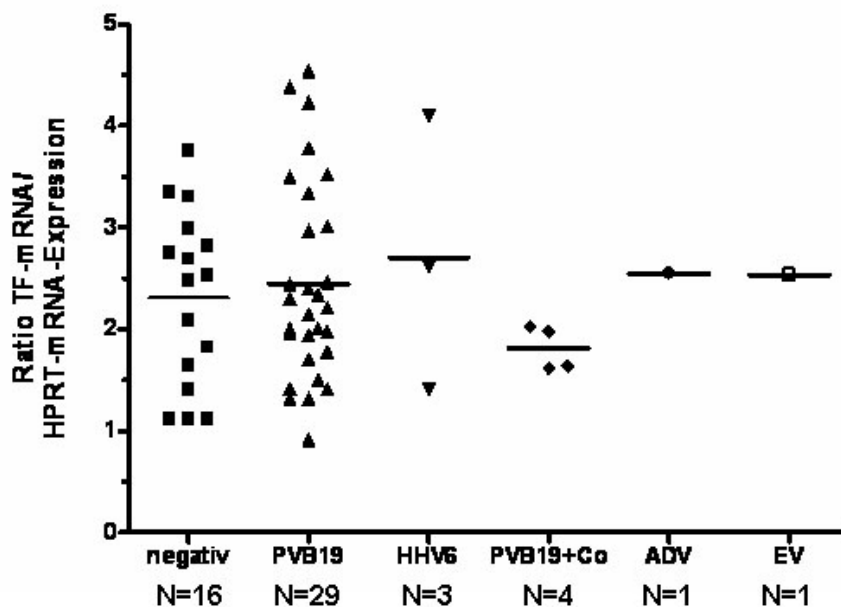


Abbildung 24. Tissue Factor-Expression in Abhängigkeit vom Nachweis viraler Genome im Myokard von Patienten mit vermuteter akuter Myokarditis (MC) bzw. inflammatorischer Kardiomyopathie (CM). Endomyokardbiopsien wurden von Patienten mit akuter MC bzw. inflammatorischer CM entnommen und hinsichtlich der TF-Genexpression untersucht. Der Nachweis der viralen Genome erfolgte wie von Kühl et al. beschrieben (Kühl et al., 2003). Gezeigt ist die TF-Genexpression bezogen auf die Expression von HPRT (ADV: Adenoviren; EV: Enteroviren; HHV6: Humanes Herpes Virus 6; PVB19: Parvovirus B19; PVB19+Co: Koinfektion von PVB19 und anderen kardiotropen Viren).

5.2.4 Tissue Factor-Expression und myokardiale Entzündungsreaktion

Um festzustellen, ob die TF-Expression abhängig von der myokardialen Endothel-aktivierung und/oder myokardialen Entzündungsreaktion war, wurde die Expression von E-Selektin (CD62E) auf mRNA-Ebene in den EMBs bestimmt und mit der TF-mRNA-Expression korreliert.

Auffällig war die positive Korrelation der gemessenen TF-Expression mit einem Marker der endothelialen Aktivierung E-Selektin (CD62E: $\rho=0,523$; $P<0,0001$; $N=54$) im Myokard der untersuchten Patienten (Abbildung 25).

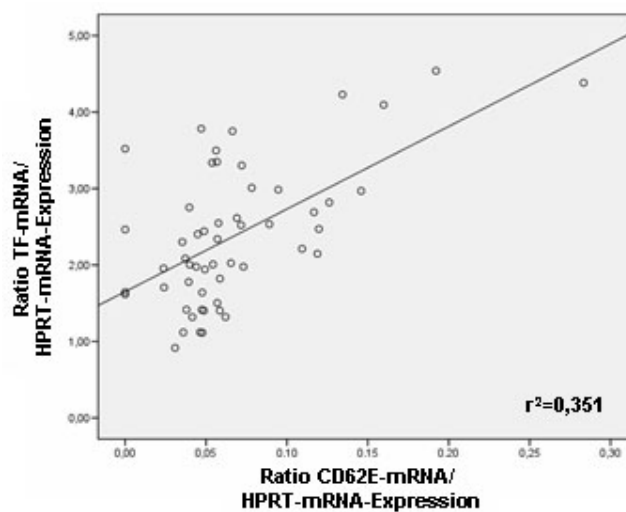


Abbildung 25. Korrelation der myokardialen Tissue Factor-Genexpression mit der CD62E-Expression (E-Selektin). Die Genexpressionen wurden parallel in einer EMB mittels einer modifizierten TaqMan® PCR (siehe 4.7) ermittelt und auf die Expression von HPRT bezogen ($N=54$).

Die TF-mRNA-Expression korrelierte schwach negativ nur mit der Expression von CD3d innerhalb derselben Biopsie ($\rho=-0,313$; $P<0,05$; $N=54$). Bemerkenswert war jedoch die fehlende Korrelation zwischen den ausgezählten eingewanderten CD3⁺-Zellen und der gemessenen CD3d-Expression ($\rho=0,105$; $P=0,450$; $N=54$). Die negative Assoziation der TF-Expression mit der CD3d-Expression könnte auf eine negative Rückkopplung der TF-Promoteraktivität hindeuten. Ferner ist die fehlende signifikante Korrelation zwischen CD3⁺-Zellen und CD3d-mRNA-Expression ein Hinweis darauf, dass die Bestimmung der Zellzahlen oftmals nicht hinreichend genau ist, da diese an einer separaten EMB mittels immunhistochemischer Färbungen für zellspezifische Antigene (CD3) und nachfolgende bildgebundene Auswertung erfolgte.

5.2.5 Assoziation der myokardialen Tissue Factor-Expression mit krankheitsrelevanten Markern

Genexpressionsanalysen für verschiedene krankheitsrelevante Gene wurden anhand einer EMB mittels der modifizierten TaqMan® PCR (4.7.2) durchgeführt, um eine mögliche Assoziation von TF mit diesen Genen zu finden.

Wie in der nachfolgenden Abbildung 26 ersichtlich, korrelierte die TF-Expression innerhalb derselben untersuchten Biopsie mit Markern des kardialen Matrixumbaus wie Tissue Inhibitor of Metalloprotease 4 (TIMP-4; $\rho=0,316$; $P<0,01$; $N=54$), Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA; $\rho=0,382$; $P<0,005$; $N=54$) *cysteine-rich angiogenic inducer 61* (CYR61; $\rho=0,431$; $P<0,0005$, $N=54$) und Kollagen IV ($\rho=0,521$; $P<0,0001$; $N=54$). Zwischen Kollagen I und TF lag nur im Trend eine Korrelation vor ($\rho=0,235$; $P=0,087$; $N=54$).

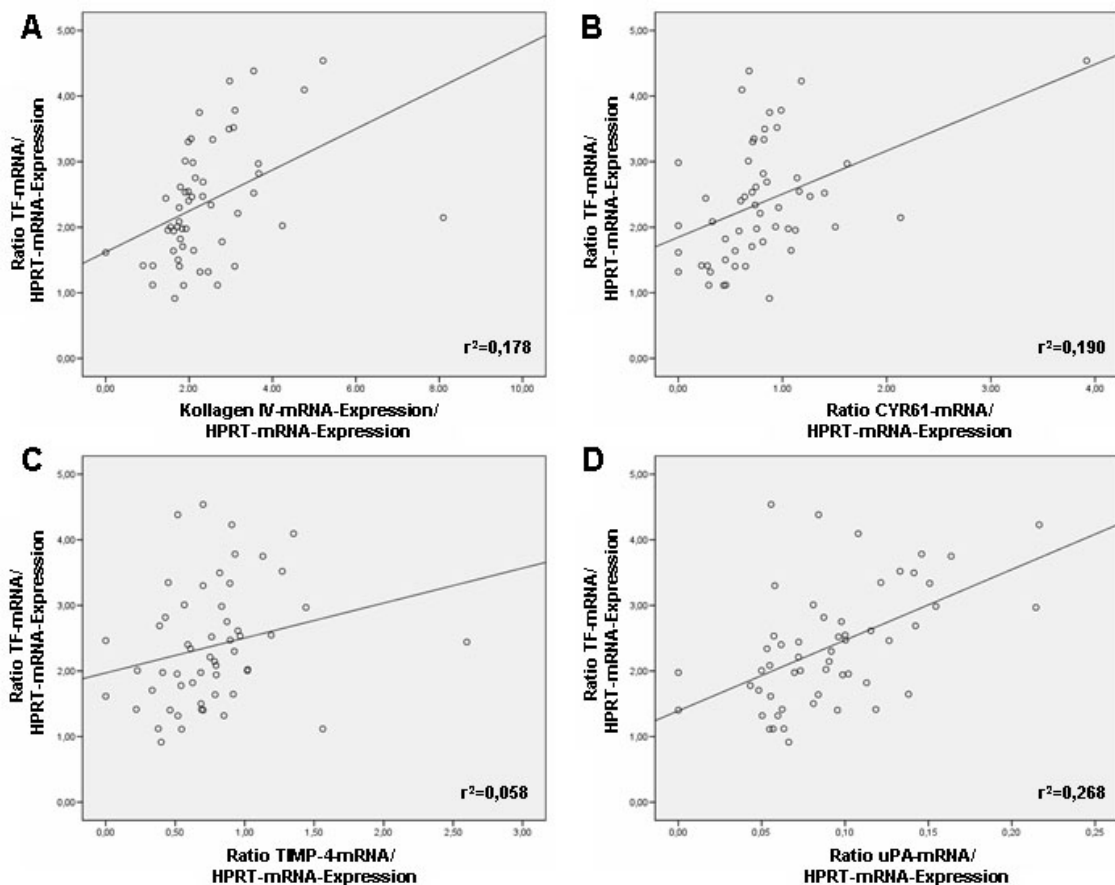


Abbildung 26. Assoziation der myokardialen Tissue Factor-Expression mit Markern des extrazellulären Matrixumbaus. Die Genexpressionen wurden parallel in einer EMB mittels einer modifizierten TaqMan® PCR (siehe 4.7) ermittelt und auf die Expression von HPRT bezogen. **A)** TIMP-4, **B)** uPA, **C)** CYR61 und Kollagen IV **(D)** ($N=54$).

Ergebnisse

Die unterschiedlichen TF-Expressionsspiegel korrelierten ferner mit zellulären Signalkaskadenmitgliedern, die sich an den TF-Promoter binden oder mit dessen Aktivierung assoziiert sind, wie AP-1 ($\rho=0,308$; $P<0,05$; $N=54$), p38 (MAPK14: $\rho=0,541$; $P<0,0001$; $N=54$) und MAPK8 einem Mitglied des JNK-Pathways ($\rho=0,454$; $P<0,001$; $N=54$).

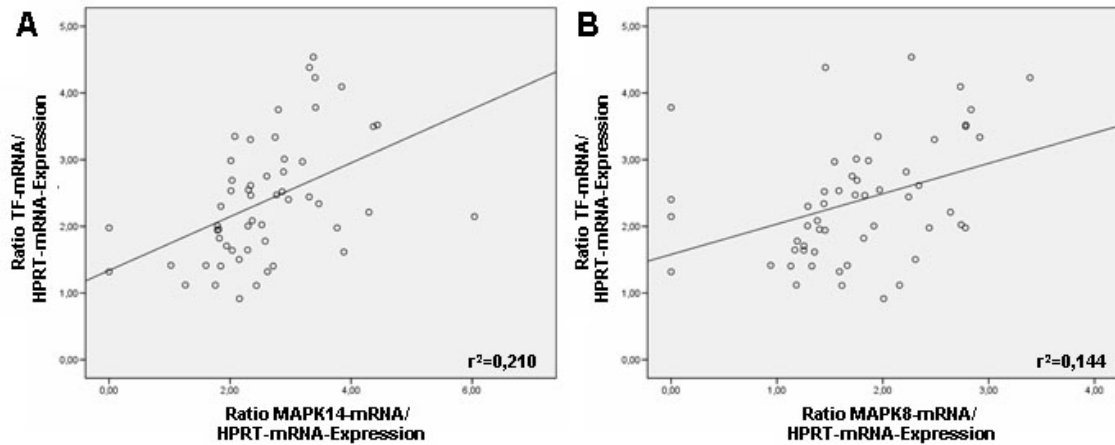


Abbildung 27. Korrelation der myokardialen Tissue Factor-Expression mit der Expression von Transkriptionsfaktoren des Tissue Factor-Promoters. Die Genexpressionen wurden parallel in einer EMB mittels einer modifizierten TaqMan® PCR (siehe 4.7) ermittelt und auf die Expression von HPRT bezogen. **A)** MAPK 14 (p38), **B)** MAPK 8 (JNK) ($N=54$).

5.3 Die Regulation der Tissue Factor-Genexpression in Kardiomyozyten

Im nachfolgenden Teil werden Daten präsentiert, die durch Experimente an Kardiomyozyten *in vitro* gewonnen wurden. Die verwendete murinen Zelllinie HL-1 bietet die Möglichkeit, den Einsatz von primären Kardiomyozyten zu reduzieren. HL-1 Zellen exprimieren wie native Kardiomyozyten TF und Strukturproteine wie Desmin. Beide Proteine ko-lokalisieren wie für primäre Kardiomyozyten beschrieben auch in den HL-1 Zellen (Abbildung 28).

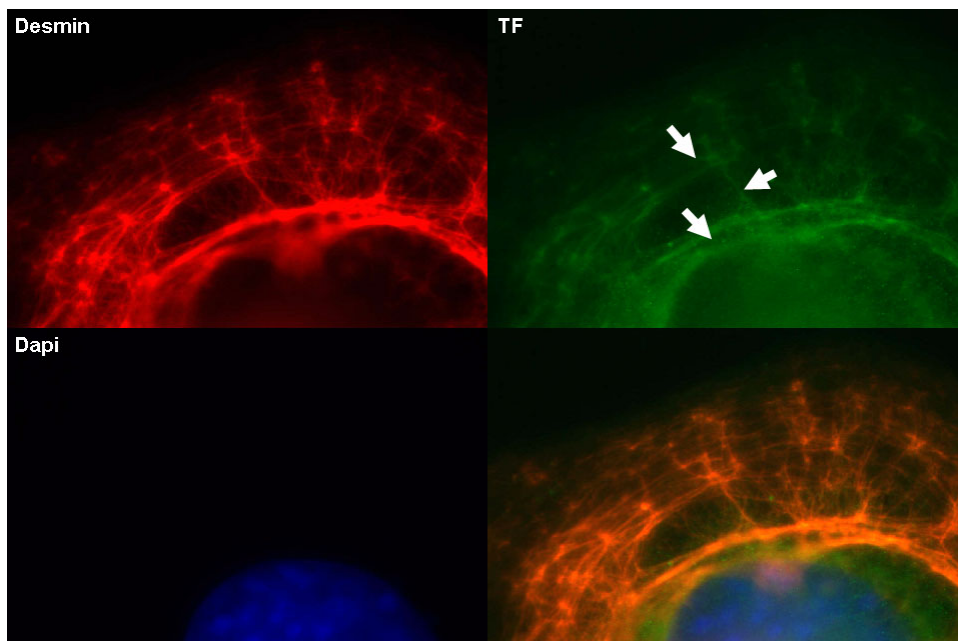


Abbildung 28. Immunfluoreszenzfärbung der Ko-Lokalisation von Desmin und Tissue Factor (TF) in HL-1 Zellen. HL-1 Kardiomyozyten wurden mit spezifischen gegen Desmin (rot) und TF (grün) gerichteten Antikörpern gefärbt. In den HL-1 Kardiomyozyten ist TF (weiße Pfeile) mit Desmin räumlich assoziiert. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (Originalvergrößerung 1000x).

5.3.1 Die kardiomyozytäre Tissue Factor-Expression nach Stimulation mit TNF- α

HL-1 Kardiomyozyten wurden mit TNF- α (10 ng/mL) stimuliert, um zu überprüfen, ob pro-inflammatorische Zytokine einen Einfluss auf die kardiomyozytäre TF-Expression besitzen.

Die Stimulation mit TNF- α über 2 Stunden ließ die TF-mRNA-Expression auf das $3,45 \pm 0,65$ -fache ansteigen (Abbildung 29; $P < 0,001$ vs. Kontrollzellen). Der Anstieg der TF-mRNA-Expression als Reaktion auf die Zytokin-Stimulation wurde auf das Niveau der Kontrollen gesenkt, wenn die Zellen mit selektiven Inhibitoren für JNK, ERK1/2 oder p38 vorinkubiert wurden (Abbildung 29; $P < 0,001$ vs. TNF- α).

Die konstitutive (basale) TF-mRNA-Expression der HL-1 Zellen war nur dann auf $64,69 \pm 0,07\%$ des Kontrolllevels reduziert, wenn der intrazelluläre JNK-Signalweg mit 10 μ M SP600125 gehemmt wurde ($P < 0,001$ Abbildung 29).

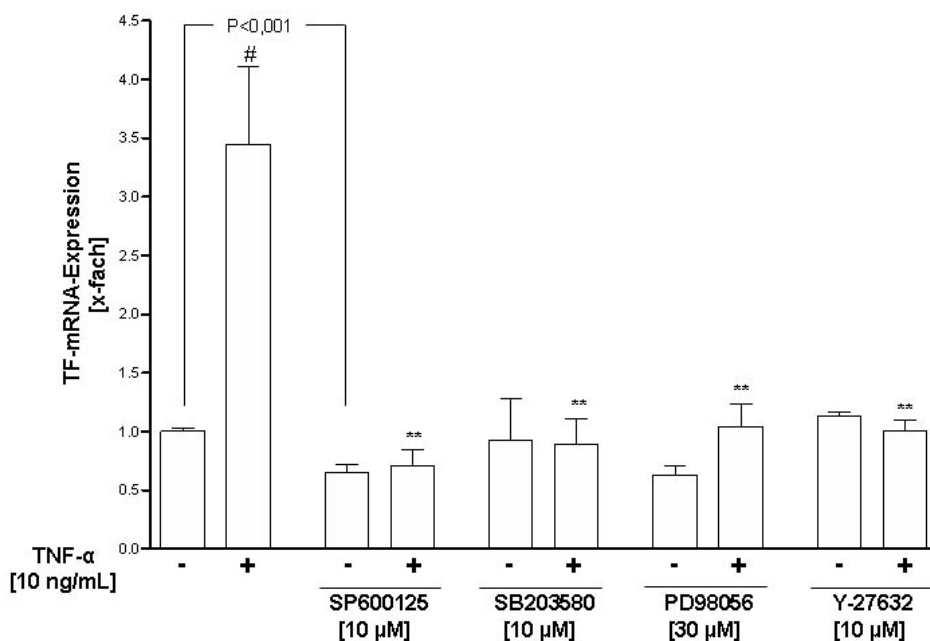


Abbildung 29. Zytokin-Stimulation erhöht die Tissue Factor-Expression in HL-1 Kardiomyozyten. Einfluss von unterschiedlichen Signalkaskaden bei der Basal- und Zytokin-induzierten TF-Expression. Die TF-mRNA wurden nach einstündiger Vorinkubation mit oder ohne anschließende zweistündige TNF- α -Stimulation mittels der TaqMan® PCR quantifiziert. Die Ergebnisse wurden auf die nichtstimulierte Kontrolle normalisiert. Als Inhibitoren für die Signalkaskaden wurden SP600125 für JNK, SB203580 für p38, PD98056 für ERK1/2 und Y-27632 für ROK verwendet (# $P < 0,001$ vs. nicht stimulierte Kontrollen; ** $P < 0,001$ vs. TNF- α ; $N > 5$).

Ergebnisse

Die Stimulation von primären neonatalen Mauskardiomyozyten bestätigten die oben aufgeführten Ergebnisse zur JNK-vermittelten Zytokin-induzierten TF-Expression in murinen HL-1 Kardiomyozyten (Abbildung 30).

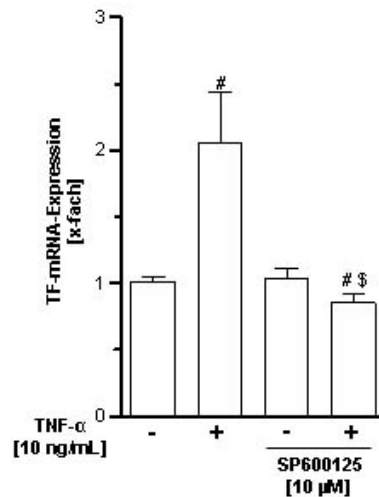


Abbildung 30. Tissue Factor mRNA-Induktion bei nativen murinen Kardiomyozyten. Neonatale Kardiomyozyten wurden isoliert und anschließend für 120 min mit TNF- α mit oder ohne Vorinkubation mit SP600125 stimuliert. Die TF-mRNA-Spiegel wurden mittels der TaqMan® PCR ermittelt. Die Expression der unstimulierten Kontrolle wurde auf eins normalisiert (# $P < 0,05$ vs. Kontrollen; \$ $P < 0,05$ vs. TNF- α ; $N > 5$).

Die Expression des spezifischen Inhibitors vom TF/FVIIa-Pathway (TFPI-1) sank nach zweistündiger TNF- α Stimulation auf etwa $84,11 \pm 3,99\%$ der Expression der Kontrollen (Abbildung 31).

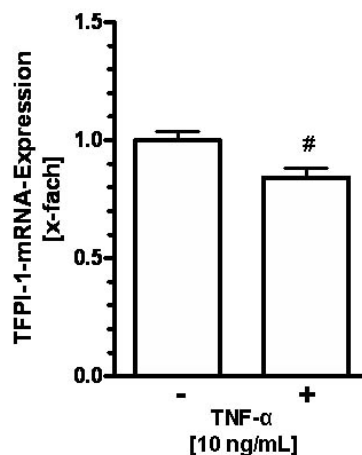


Abbildung 31. Relative Tissue Factor Pathway Inhibitor-1-mRNA-Expression nach TNF- α -Stimulation. HL-1 Zellen wurden 120 min mit TNF- α stimuliert und die TFPI-1-Genexpression mittels TaqMan® PCR bestimmt. Die Expression der unstimulierten Kontrolle wurde auf eins normalisiert (# $P < 0,05$ vs. Kontrolle; $N = 4$).

Ergebnisse

Die gemessenen TF-mRNA-Mengen korrespondierten mit den semiquantitativ bestimmten Proteinmengen (Abbildung 32). Eine Vorinkubation mit den spezifischen Inhibitoren für JNK, ERK1/2 und p38 reduzierte die TNF- α -induzierte TF-Proteinexpression (Abbildung 32; $P < 0,001$ vs. TNF- α). Im Gegensatz zu ERK1/2 und p38 reduziert nur die JNK-Inhibierung die basale TF-Proteinexpression der Kardiomyozyten auf $36,17 \pm 0,05\%$ ($P < 0,001$; Abbildung 32).

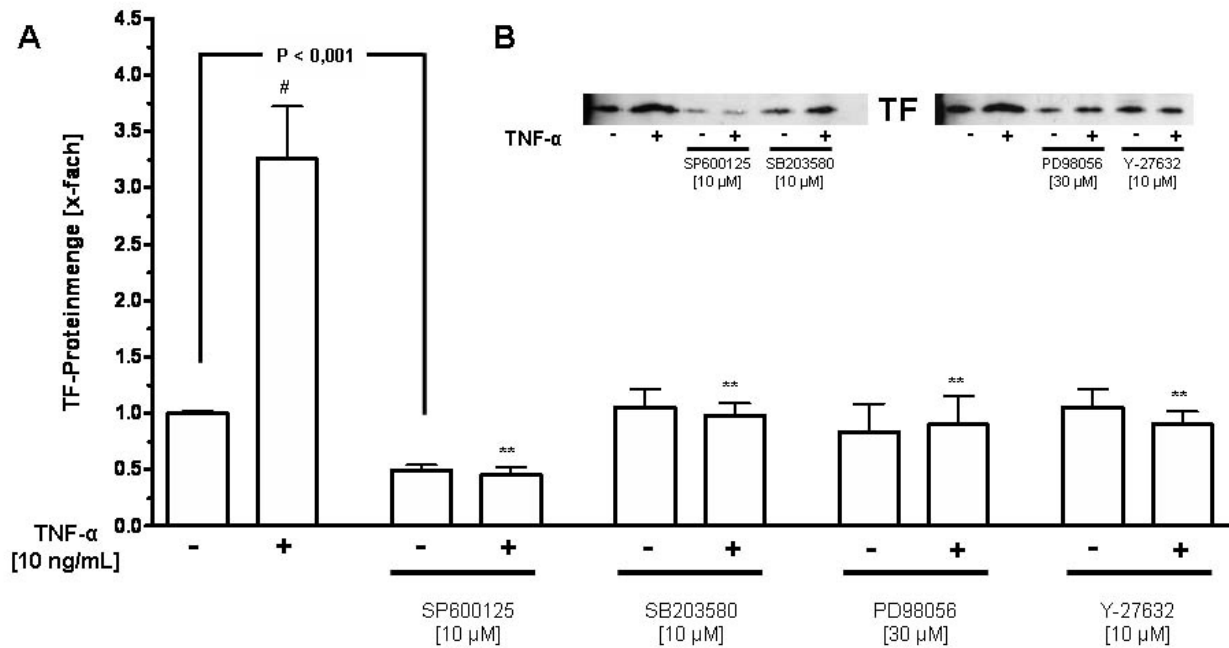


Abbildung 32. TNF- α induziert die Tissue Factor-Proteinexpression bei HL-1 Kardiomyozyten *in vitro*. Veränderungen der TF Proteinmenge in Kardiomyozyten in Abhängigkeit der unterschiedlichen Signalkaskaden und Stimulation mit TNF- α (10 ng/mL). **A.)** Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der Western Blots für die TF-Proteinexpression. Die Proteinexpression wurde auf die TF-Proteinexpression der nicht stimulierten Kontrollen bezogen. **B.)** Repräsentativer Western Blot für TF (46 kDa). Als Inhibitoren für die Signalkaskaden wurden SP600125 für JNK, SB203580 für p38, PD98056 für ERK1/2 und Y-27632 für ROK verwendet (# $P < 0,001$ vs. unstimulierter Kontrolle; ** $P < 0,001$ vs. TNF- α ; $N > 5$).

Ergebnisse

Die Wirkung von TNF- α (10 ng/mL) auf die TF-Proteinexpression wurde zusätzlich mittels Immunfluoreszenzfärbungen mit TF-spezifischen Antikörpern analysiert. In unstimulierten Zellen war nur wenig TF nachweisbar (Abbildung 33 A-C). Nach Stimulation der HL-1 Zellen mit TNF- α zeigte sich sowohl für TF als auch für aktivierte Caspase 3 (Abbildung 33 D-F) eine verstärkte Färbung. Dies deutet auf eine Induktion von TF und Apoptose durch TNF- α hin.

Ferner wurde der TNF- α -induzierte Zelltod (Apoptose) der HL-1 Zellen durch Quantifizierung der Caspase 3-Aktivierung im Durchflusszytometer bestimmt. Eine TNF- α -Behandlung über 24 h erhöhte den Anteil der aktiven Caspase 3-positiven HL-1 Zellen von $8,8 \pm 0,7\%$ auf $25,5 \pm 3,4\%$ ($P < 0,05$).

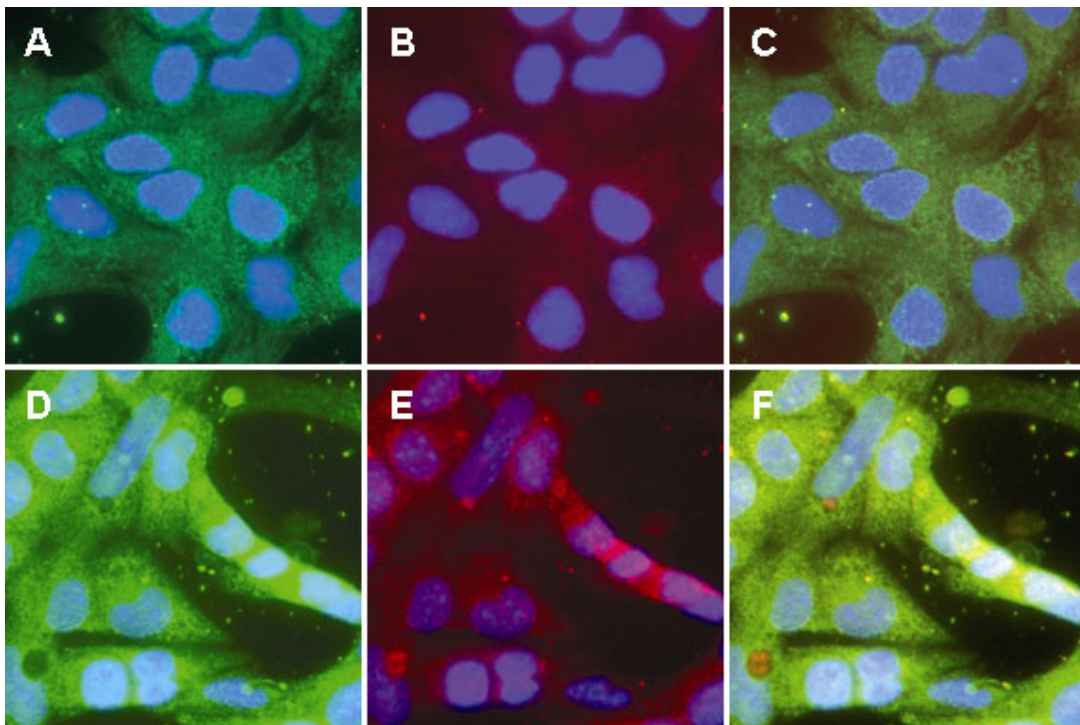


Abbildung 33. Detektion von zellulären Tissue Factor und aktiver Caspase 3 in HL-1 Kardiomyozyten nach TNF- α -Stimulation. HL-1 Zellen wurden auf Glasobjektträgern ausgesät, über 48 Stunden ausgehungert und anschließend mit TNF- α (10 ng/mL) für 24 Stunden stimuliert. Die behandelten Zellen wurden mit gegen TF (MFP488, grün) und aktivierter Caspase 3 (MFP555, rot) spezifischen Antikörper gefärbt. (A-C) unstimulierten Kontrollen, (D-F) nach TNF- α -Stimulation (C.) und F.) sind die jeweiligen Übereinanderlagerungen der TF- und aktiver Caspase 3-Aufnahmen. Die Gegenfärbung der Zellkerne (blau) erfolgte mit DAPI (Originalvergrößerung 100x).

Ergebnisse

Die TF-Proteinaktivität lässt sich durch die TF-vermittelte FXa-Generation bestimmen. Parallel zu der gesteigerten TF-Proteinexpression wurde eine durch TNF- α -Stimulation erhöhte zelluläre TF-Aktivität beobachtet ($2,40 \pm 0,30$ -fach; Abbildung 34; $P < 0,005$). Wie schon gezeigt, verminderte nur die Hemmung von JNK durch SP600125 den TNF- α -bedingten Anstieg der TF-Aktivität ($P < 0,001$; Abbildung 34).

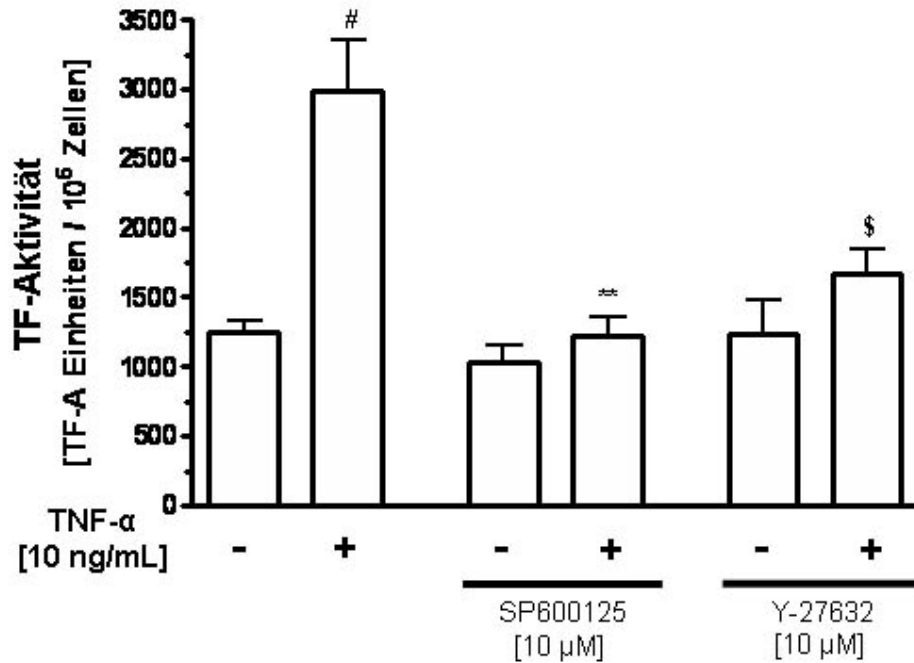


Abbildung 34. TNF- α erhöht die Tissue Factor-spezifische Thrombogenität von Kardiomyozyten *in vitro*. Die TF-spezifische FXa-Entstehung (4.11.1) wurde in Abhängigkeit der TNF- α -Stimulation und der Inhibition des JNK- (SP600125) bzw. des RhoA- (Y-27632) Signalweges untersucht (# $P < 0,001$ vs. unstimulierte Kontrollen; ** $P < 0,001$ vs. TNF- α ; \$ $P < 0,01$ vs. TNF- α , $N > 5$).

5.3.2 Die Entstehung von kardiomyozytären Mikropartikeln via RhoA-Aktivierung

Der Überstand von TNF- α behandelten HL-1 Zellen wurde auf die Möglichkeit hin untersucht, ob Kardiomyozyten nach Zytokin-Stimulation MP freisetzen (Abbildung 35).

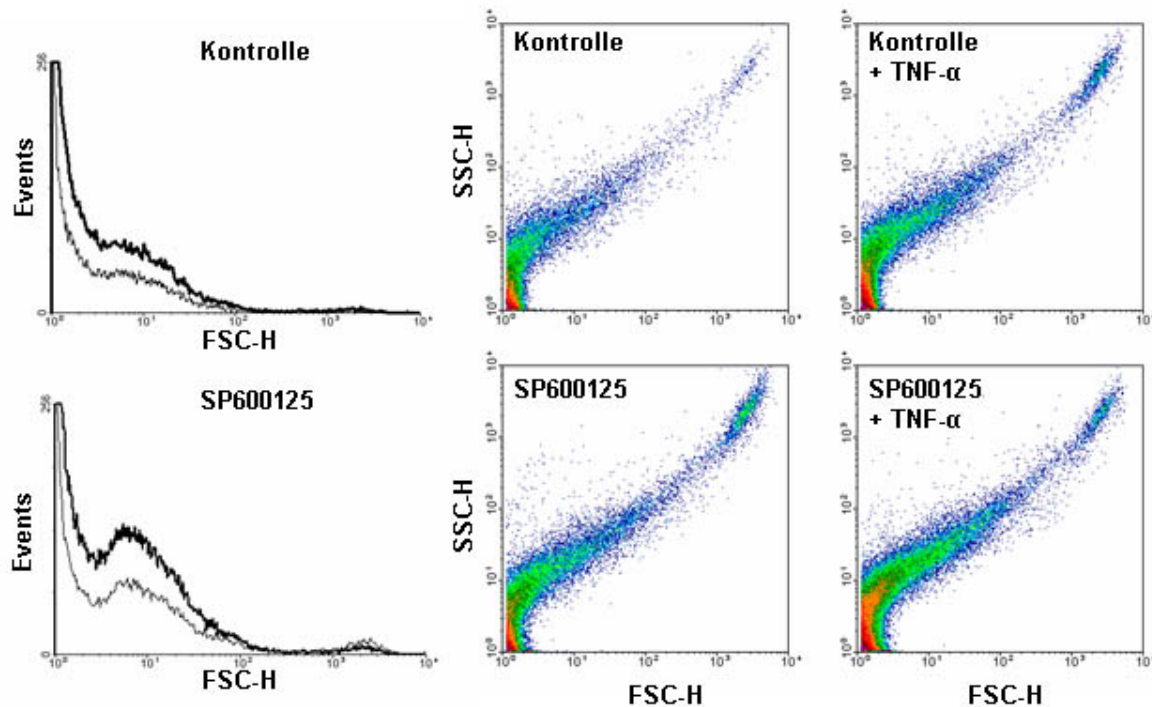


Abbildung 35. Mikropartikel-Freisetzung durch TNF- α -Stimulation und JNK-Inhibierung. HL-1 Kardiomyozyten wurden mit dem JNK-Inhibitor (10 μ M SP600125) vorinkubiert und anschließend mit oder ohne TNF- α (10 ng/mL) über 24 Stunden stimuliert. Die Freisetzung der Mikropartikel (MP) wurde durchflusszytometrisch untersucht. Die Abbildung zeigt repräsentative Durchflusszytometerergebnisse der Zellkulturüberstände als Histogramm (links) und *Density Plot* (rechts). Die obere Reihe zeigt Kontrollzellergenergebnisse und die untere Reihe die Folge einer JNK-Inhibierung (Dünne Linie = Überstand ohne TNF- α -Stimulation; Dicke Linie = Überstand nach TNF- α -Zugabe).

Ergebnisse

Die Anzahl der von Kardiomyozyten abgeschnürten MP war nach TNF- α -Stimulation verglichen mit den Kontrollen um das $2,47 \pm 0,15$ -fache erhöht (Abbildung 36; $P < 0,01$). Eine Vorinkubation der HL-1 Zellen mit SP600125 ohne nachfolgende Zytokin-Stimulation resultierte in einer Freisetzung von MP in den Überstand, die signifikant höher war als bei alleiniger TNF- α -Behandlung ($4,88 \pm 0,63$ -fach; $P < 0,001$; Abbildung 36). Die zusätzliche TNF- α -Stimulation der mit dem JNK-Inhibitor vorinkubierten HL-1 Zellen hatte nur noch geringe Effekte auf die MP-Freisetzung (Abbildung 36).

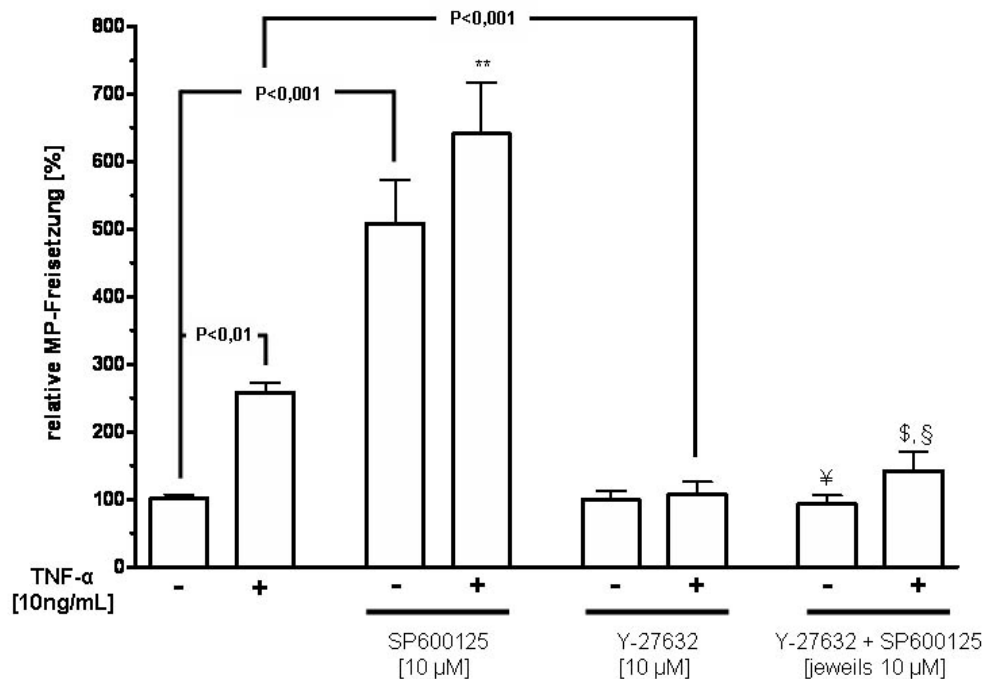


Abbildung 36. Kardiomyozyten geben nach Zytokin-Stimulation Mikropartikel in den Überstand ab. Durchflusszytometrische Detektion und Quantifizierung von kardiomyozytären Mikropartikeln (MP). Konditioniertes Zellkulturmedium wurde von serumfrei-kultivierten HL-1 Zellen nach 24 stündiger TNF- α -Stimulation mit oder ohne JNK- oder ROK-spezifische Inhibitorvorinkubation gewonnen (** $P < 0,001$ vs. unstimulierte Kontrollen; ¥ $P < 0,001$ vs. SP600125; \$ $P < 0,001$ vs. TNF- α ; § $P < 0,001$ vs. SP600125 + TNF- α ; $N > 5$).

Ergebnisse

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob die TNF- α -Inkubation und JNK-Inhibierung den RhoA-Signalweg aktivierte. Die Stimulation mit TNF- α sowie die JNK-Inhibierung waren mit einer erhöhten RhoA-Phosphorylierung und somit RhoA-Aktivierung assoziiert (Abbildung 37).

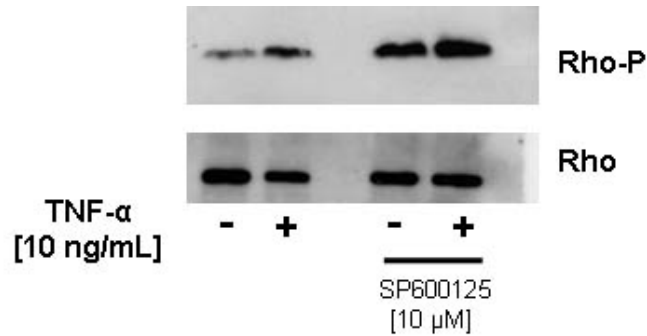


Abbildung 37. Die Mikropartikel-Freisetzung ist abhängig vom RhoA-Signalweg. Repräsentativer Western Blot für den durchgeführten RhoA-Aktivitätstest, gemessen an der RhoA-Phosphorylierung (siehe 4.14.4). Als spezifischer Inhibitor für den JNK-Signalweg wurde SP600125 verwendet.

Ferner reduzierte eine Vorinkubation mit dem ROK-Inhibitor die Zytokin-vermittelte MP-Freisetzung auf Basalniveau (Abbildung 36). Die Behandlung mit Y-27632 verhinderte vollständig die durch JNK-Inhibierung induzierte MP-Abschnürung (Abbildung 36). Die durch kombinierte TNF- α -Stimulation und JNK-Inhibierung verursachte Freisetzung von MP war ebenfalls komplett durch Y-27632 aufgehoben. Der ROK-Inhibitor besaß weder einen Einfluss auf die TF-Expression (Abbildung 29 und 32) noch auf die MP-Generation (Abbildung 36).

5.3.3 Die Bedeutung kardiomyozytärer Mikropartikel für die Thrombogenität des extrazellulären Raumes

MP wurden mittels Ultrazentrifugation isoliert und die TF-vermittelte FXa-Generation analysiert, um das prothrombogene Potential der MP zu bestimmen. Eine erhöhte MP-Freisetzung als Folge einer TNF- α -Stimulation war ebenfalls mit einer erhöhten MP-assoziierten TF-Aktivität verbunden (Abbildung 38 A).

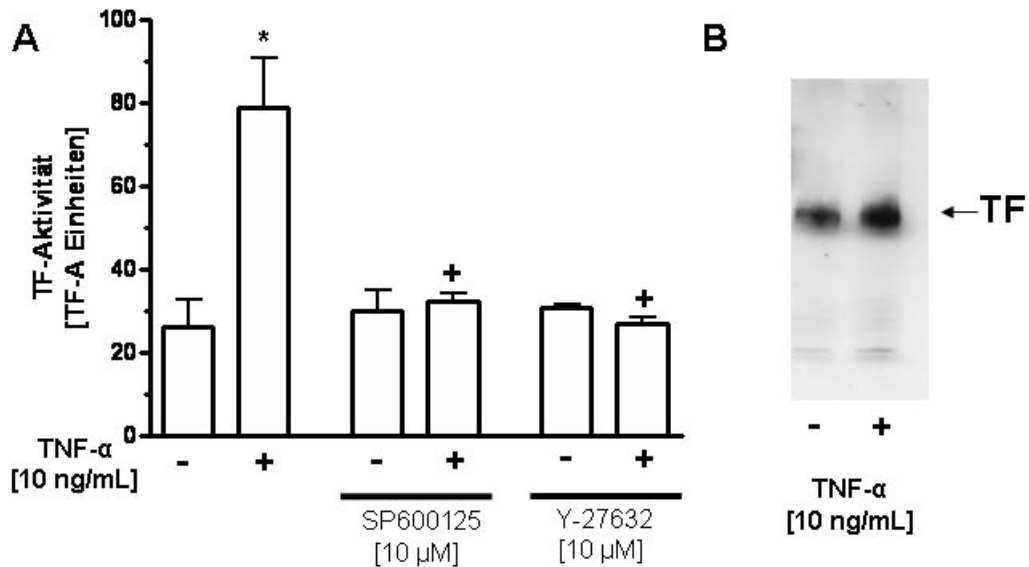


Abbildung 38. Kardiomyozyten setzen thrombogene Mikropartikel nach TNF- α -Stimulation frei. Die Kardiomyozyten wurden mit oder ohne spezifische Inhibitoren behandelt, um den Einfluss von verschiedenen Signalkaskaden auf die Freisetzung der TF-positiven thrombogenen Mikropartikel (MP) zu bestimmen. **A.)** TF-abhängige FXa-Generation von isolierten MP aus dem konditionierten Zellkulturmedium (24 h) von nicht-stimulierten und stimulierten Zellen (4.11.1). **B.)** Repräsentativer Western Blot für TF (46 kDa) von 100 μ g Proteinlysate aus isolierten MP von konditioniertem Medium (24 h) der Kontrollen und der mit TNF- α (10 ng/mL) stimulierten Zellen (* $P < 0,05$ vs. Kontrollen; + $P < 0,05$ vs. TNF- α ; $N > 6$).

Der Einsatz des JNK-Inhibitors vor der TNF- α -Behandlung reduzierte die TNF- α -induzierte Erhöhung der MP-assoziierten TF-Aktivität signifikant (Abbildung 38). Die TNF- α -induzierte Thrombogenität der MP wurde annähernd auf den Kontrollwert gesenkt, wenn die Zellen mit dem ROK-Inhibitor vorinkubiert wurden (Abbildung 38). Analysen isolierter MP von unstimulierter und mit TNF- α -stimulierter HL-1 Zellen mittels Western Blot zeigten, dass der Anstieg der TF-Aktivität mit einem vermehrten TF-Proteingehalt der MP assoziiert war (Abbildung 38 B).

5.3.4 Die Mikropartikel-Entstehung in Assoziation mit der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts

Um festzustellen, ob die MP-Freisetzung von den intrazellulären Kontraktionen des Aktin-Myosin-Zytoskeletts abhängt und durch RhoA vermittelt werden, wurden HL-1 Kardiomyozyten mit spezifischen Inhibitoren für ROK and JNK vorinkubiert und anschließend mit TNF- α stimuliert. Durch die Kombination aus Inhibitor- und Zytokin-Stimulation sollte überprüft werden, ob die MP-Generation mit einer Reorganisation der intrazellulären Aktinfasern assoziiert war.

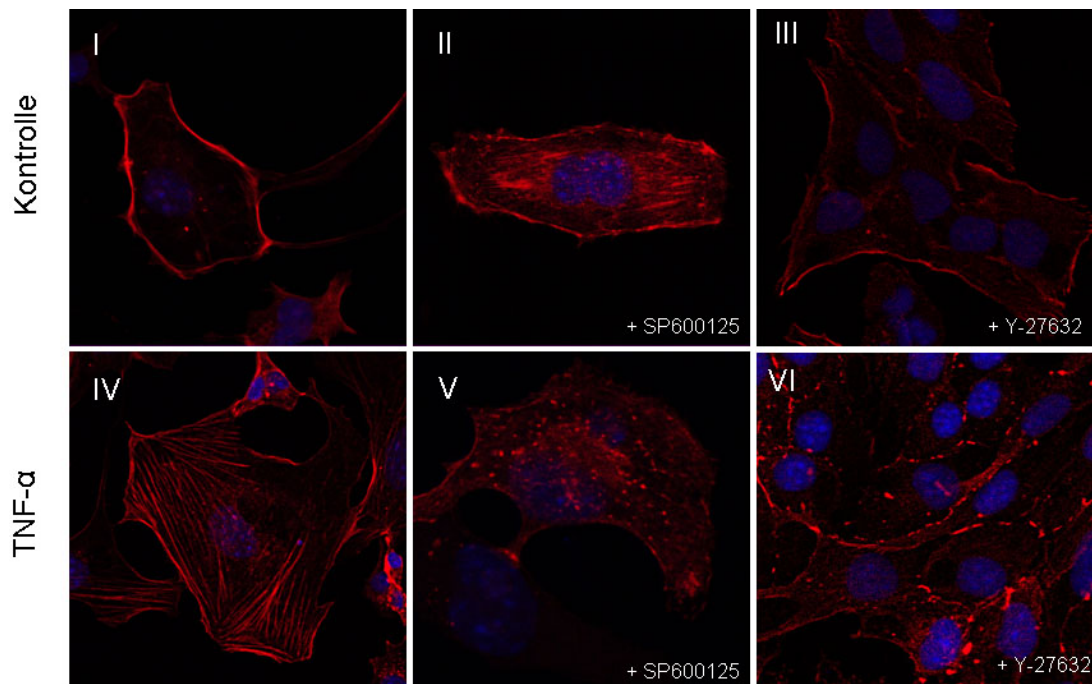


Abbildung 39. Der zytoskeletaler Umbau als Reaktion auf die TNF- α -Stimulation. HL-1 Zellen wurden auf geeigneten Objektträgern ausgehungert und für Aktin (Phalloidin-MFP547, rot) gefärbt. Die Visualisierung der Zellkerne erfolgte mit TO-PRO 3 (blau). Kontrollen (I, II, III) = nicht-stimulierte HL-1 Zellen; TNF- α (IV; V; VI) = Kardiomyozyten stimuliert mit 10 ng/mL TNF- α für vier Stunden. Zur Analyse des Einflusses des JNK- bzw. des RhoA-Signalweges auf das Zytoskelett wurden eine Stunde vor TNF- α -Stimulation die spezifischen Inhibitoren (jeweils 10 μ M SP600125 bzw. Y-27632) in das Basalmedium hinzugegeben (Originalvergrößerung 200x).

Der Umbau des Aktin-Zytoskeletts wurde mittels farbmarkiertem Phalloidin sichtbar gemacht (Abbildung 39). Die unstimulierten Kontrollen und die mit dem ROK-Inhibitor behandelten Zellen zeigten eine normale Anordnung der Aktin-Bündel nahe der Zellmembran und zellulärer Kontaktstellen. Die Inhibierung von JNK ohne anschließende TNF- α -Stimulation als auch eine TNF- α -Behandlung der Zellen mit oder ohne vorherige SP600125-Inkubation hatte eine Reorganisation des Aktin-

Zytoskeletts zur Folge. Diese Kardiomyozyten zeigten Stress-Fasern und/ oder eine totale Auflösung der Aktin-Bündel. . Eine ROK-Inhibierung mit Y-27632 reduzierte die beschriebenen TNF- α -verursachten Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts (Abbildung 39).

5.3.5 Diffusion von kardiomyozytären Mikropartikeln durch das Endothel

Um nachzuweisen, ob Kardiomyozyten die Endothelfunktion beeinflussen und dadurch die Diffusion von kardiomyozytären MP durch das Endothel begünstigen, wurden kardiale Endothelzellen der Maus und HL-1 Kardiomyozyten in einem Zwei-Kammer-Zellkultursystem ko-kultiviert. Beide Zelltypen wurden nur durch eine porenversetzte Membran (8 μ m Porengröße) getrennt.

Eine Stimulation der Kardiomyozyten mit TNF- α führte zur Bildung von TF-positiven MP. Diese diffundierten durch die endotheliale Zellschicht ins extrazelluläre endotheliale Kompartiment (MP-Diffusion $18,15 \pm 1,67\%$ vs. $44,36 \pm 5,45\%$; $P < 0,05$ unstimulierte Kontrolle vs. TNF- α ; Abbildung 40). Die Fähigkeit der kardiomyozytären MP, durch das Endothel zu diffundieren, deutet darauf hin, dass Kardiomyozyten unter entzündlichen Bedingungen die Thrombogenität der extrazellulären Umgebung erhöhen.

In weiterführenden Kontrollexperimenten wurde bestimmt, ob die Zytokin-Stimulation mit TNF- α *per se* ausreicht, um eine endotheliale Durchlässigkeit zu induzieren. CFSE-positive MP wurden aus dem Kardiomyozyten-konditionierten Medium isoliert und Aliquots vom nun MP-freien Medium bei 56°C für 20 min hitzeinaktiviert. Die isolierten MP wurden dem inaktivierten oder unbehandelten Medium wieder zugesetzt und die Mixturen auf die endotheliale Einzellschicht gegeben. Die Diffusion der MP durch die endotheliale Einzellschicht wurde nach Stimulation mit TNF- α (10 ng/mL) quantifiziert.

Ergebnisse

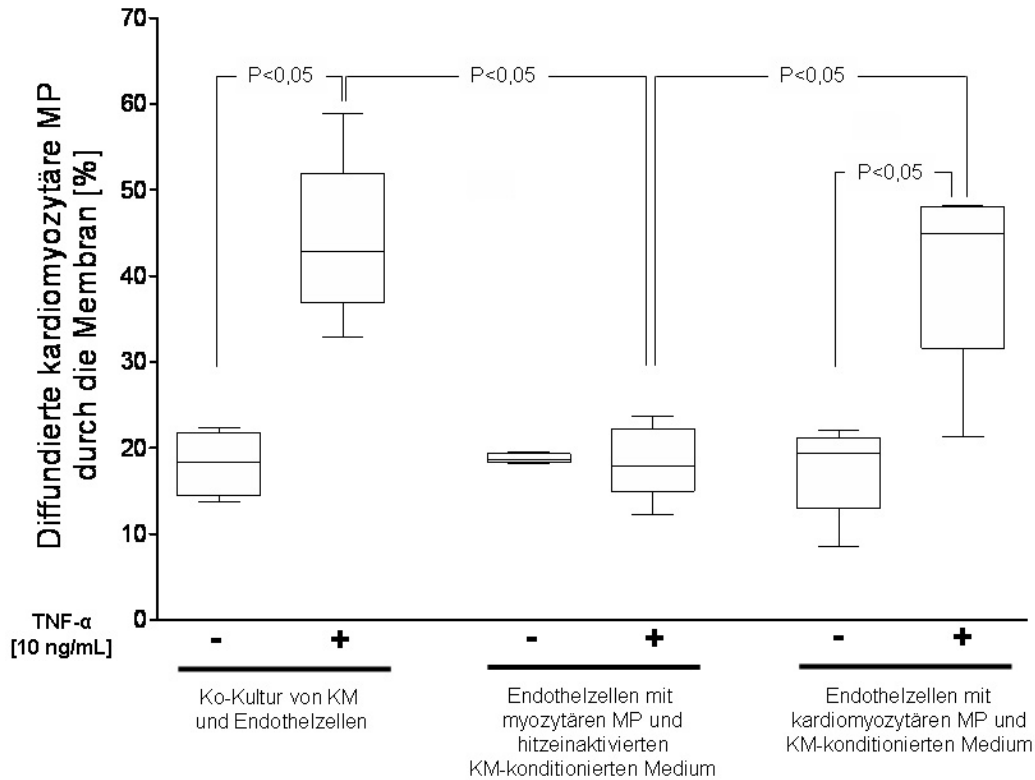


Abbildung 40. Diffusionsverhalten von kardiomyozytären Mikropartikeln durch eine endotheliale Zellschicht. Die Stimulation einer Ko-Kultur aus Kardiomyozyten (KM) und Endothelzellen mit TNF- α erhöht die Durchlässigkeit der Endothelzellschicht für kardiomyozytäre MP. Kontrolleexperimente mit von Kardiomyozyten freigesetzten MP in konditioniertem Medium, welches vor oder nach Hitzeinaktivierung benutzt wurde, lässt vermuten, dass Kardiomyozyten-spezifische Mediatoren die Permeabilität der Endothelschicht unter entzündlichen Bedingungen erhöhen (N>4).

MP im nicht-hitzeinaktivierten Medium diffundierten nach TNF- α -Behandlung der Endothelzellen durch die Zellschicht (MP-Diffusion $17,55 \pm 2,37\%$ vs. $39,80 \pm 6,36\%$; $P < 0,05$ konditioniertes Medium vs. konditioniertes Medium + TNF- α ; Abbildung 40). Der Grad der Diffusion vom MP-Kompartiment in das endotheliale Kompartiment war vergleichbar mit dem Grad der Diffusion, die beobachtet wurde, wenn HL-1 Zellen mit Endothelzellen ko-kultiviert wurden (Abbildung 40). Im Gegensatz dazu zeigt sich, dass bei Verwendung von hitzeinaktiviertem Medium zur Resuspendierung der CFSE-positiven MP selbst nach TNF- α -Behandlung keine gesteigerte Diffusion beobachtet wurde (MP-Diffusion $18,72 \pm 0,22\%$ vs. $18,33 \pm 1,55\%$, $P = n.s.$ hitzeinaktiviertes konditioniertes Medium vs. hitzeinaktiviertes konditioniertes Medium + TNF- α ; Abbildung 40). Die Experimente mit dem hitzeinaktivierten Medium lassen vermuten, dass Kardiomyozyten unbekannte Mediatoren freisetzen, die das Verhalten und die Durchlässigkeit von Endothelzellen beeinflussen.

5.3.6 Zirkulierende Mikropartikel im Plasma von Patienten mit akuten myokardialen Verletzungen

Myokardiale Entzündungsreaktionen wie nach einem akuten Myokardinfarkt sind verbunden mit einer erhöhten MP-Konzentration in der Blutzirkulation. Bisher gelang der Nachweis nicht, dass Kardiomyozyten einen Anteil an dieser Menge an MP im Blut von Patienten besitzen. Zirkulierende MP wurden deshalb aus den Plasmen von Patienten mit signifikant erhöhten myokardialen Markern wie Plasma-Kreatinin-Kinase MB (CK-MB), wie in 4.10 beschrieben, isoliert.

Die Myokardverletzung nach einem akuten Herzinfarkt, gemessen an den erhöhten CK-MB Spiegeln und der Verlust an Kardiomyozyten, sind mit im Plasma vermehrt zirkulierenden kardiomyozytären MP assoziiert. Sowohl α -kardiales Muskelaktin als auch sarkomeres Myosin sind neben TF in der MP-Fraktion nachweisbar (Abbildung 41).

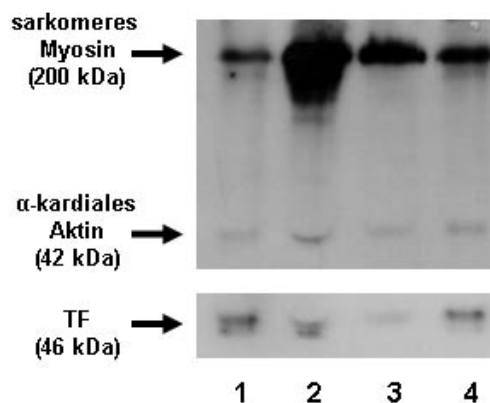


Abbildung 41. Exemplarischer Western Blot von zirkulierenden Mikropartikeln, die aus Patienten-Plasma mit akuter myokardialer Verletzungen isoliert wurden. 1.) Patient mit akutem Myokardinfarkt (CK=583 U/L; CK-MB 106 U/L); 2.) Patient mit akutem Myokardinfarkt (CK = 2979 U/L; CK-MB = 438 U/L); 3.) Patient mit stabiler koronarer Herzkrankheit (CK = 82 U/L; CK-MB = 12 U/L); 4.) Patient mit schwerer DCM nach Wiederbelebung infolge maligne Arrhythmien (CK = 2707 U/L; CK-MB = 127 U/L).

Die Experimente zur MP-Diffusion *in vitro* und die Ergebnisse der Untersuchungen von Patientenplasmen mit einer akuten myokardialen Verletzung zeigen, dass Kardiomyozyten als Quelle für TF-positive MP dienen können. Diese thrombogenen MP können bedingt durch eine inflammatorischen Umgebung wie z.B. bei akuten myokardialen Entzündungsprozessen durch das Endothel im Myokard diffundieren und somit die lokale und systemische Thrombogenität beeinflussen und die Inzidenz für thrombotische Ereignisse erhöhen.

5.4 Der Einfluss der Tissue Factor-Expression auf das zelluläre Überleben von Kardiomyozyten unter inflammatorischen Bedingungen

Um in nachfolgenden Experimenten den Einfluss der kardiomyozytären TF-Expression auf das zelluläre Verhalten wie Wachstumsgeschwindigkeit und die Induzierbarkeit von TNF- α -vermittelter Apoptose zu untersuchen, wurden zwei Strategien angewendet.

Zum einen wurde eine stabil transfizierte HL-1 Zelllinie generiert, die murinen TF überexprimierte (Abbildung 42). Als Kontrolle dienten HL-1 Zellen, die den leeren Expressionsvektor enthielten.

Zum anderen wurden Zellen generiert, die eine reduzierte TF-Expression besaßen (Abbildung 42). Zum Einsatz kam ein gut beschriebenes Tetrazyklin-induzierbare shRNA-Expressionssystem (siehe Abschnitt 4.16).

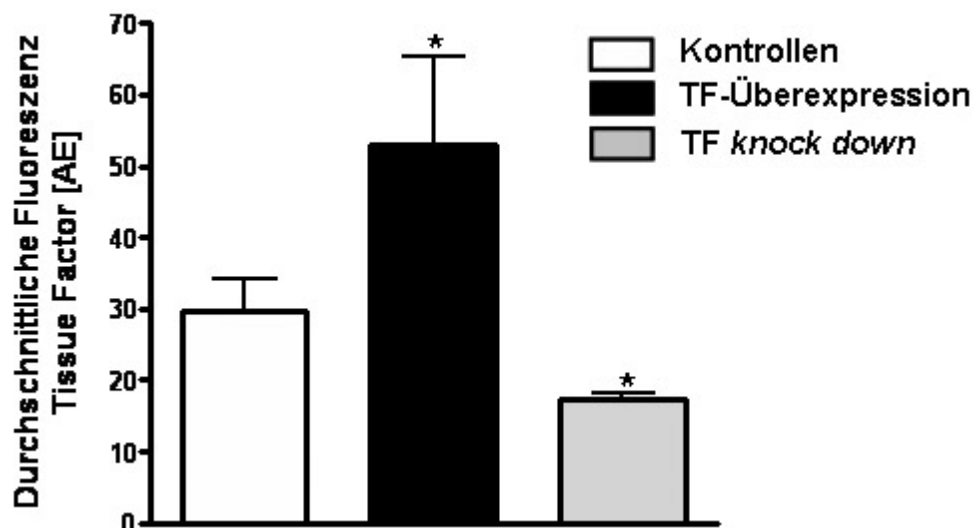


Abbildung 42. Tissue Factor-Expressionslevel der verschiedenen HL-1 Zelllinien. HL-1 Zellen wurden stabil mit einem TF-Expressionsvektor oder mit einem shRNA-Expressionsvektor (TF *knock down*) transfiziert. Die Bestimmung der TF-Proteinexpression erfolgte mit spezifischen gegen TF-gerichtete Antikörpern im Durchflusszytometer (* $P < 0,05$ vs. Kontrollen; $N > 5$).

5.4.1 Der Zusammenhang zwischen der Wachstumsgeschwindigkeit und der zellulären Tissue Factor-Expression

Anhand der verschiedenen Zellentypen, die das TF-Protein in unterschiedlichem Maß exprimieren, wurde dargestellt, dass die Wachstumsgeschwindigkeit mit der TF-Expression korrelierte.

Es zeigte sich eine positive Assoziation zwischen der Zellteilungsgeschwindigkeit (Generationsdauer) der HL-1 Zellen und der TF-Expression (Abbildung 43). Infolge einer TF-Überexpression nahm die Dauer eines Teilungszykluses ab und die Zellteilungsrate stieg (Abbildung 43 A). Umkehrt verlängerte sich die Zellzyklusdauer bei einem *knock down* der TF-Expression durch shRNA, wie in Abbildung 43 A gezeigt. Ferner wies die Zellteilungsgeschwindigkeit ebenfalls eine positive Abhängigkeit zum Proliferationsmarker Ki67 und der TF-Expression auf (Abbildung 43 B).

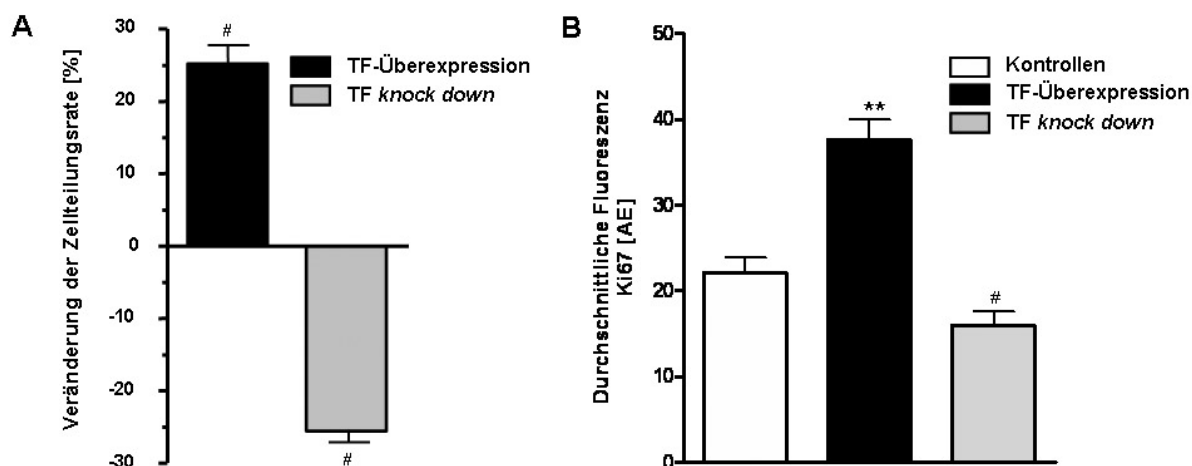


Abbildung 43. Wachstumsverhalten in Abhängigkeit der zellulären Tissue Factor-Expression.

A.) Das Zellteilungsverhalten wurde durch die CFSE-Methode (4.9.1) ermittelt. Die Veränderungen der Zellteilung sind in Prozent verglichen mit den jeweiligen Kontrollen angegeben **B.)** Die durchflusszytometrisch quantifizierte Ki67-Expression in Abhängigkeit zum TF-Expressionsniveau (# $P < 0,05$ vs. Kontrolle; ** $P < 0,005$ vs. Kontrolle; $N > 5$).

Die gesteigerte Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen bei TF-Überexpression zeigte sich auch in der Zellzyklusanalyse anhand des DNA-Gehalts. Der Anteil der sich in der Zellzyklusphase G1 befindenden TF-überexprimierenden HL-1 Zellen lag mit $54,63 \pm 0,75\%$ unter dem der Kontrollen mit $62,70 \pm 0,94\%$ ($P < 0,0001$). Somit befanden sich Zellen mit einem hohen TF-Expressionsniveau zu einem größeren Anteil in der S- bzw. G2-Phase.

5.4.2 Der Zusammenhang zwischen der Tissue Factor-Expression und der zellulären Apoptose

Um den Einfluss der TF-Expression auf das zelluläre Überleben und die zytokininduzierte Apoptose zu erfassen, wurden die generierten Zelllinien mit den unterschiedlichen TF-Expressionsniveaus und die dazugehörigen Kontrollen mit TNF- α in ansteigenden Konzentrationen stimuliert. Der Grad der Apoptose wurde mittels Doppelfärbung mit Annexin-V und Propidiumiodid und anschließender durchflusszytometrischen Quantifizierung untersucht (Abbildung 44).

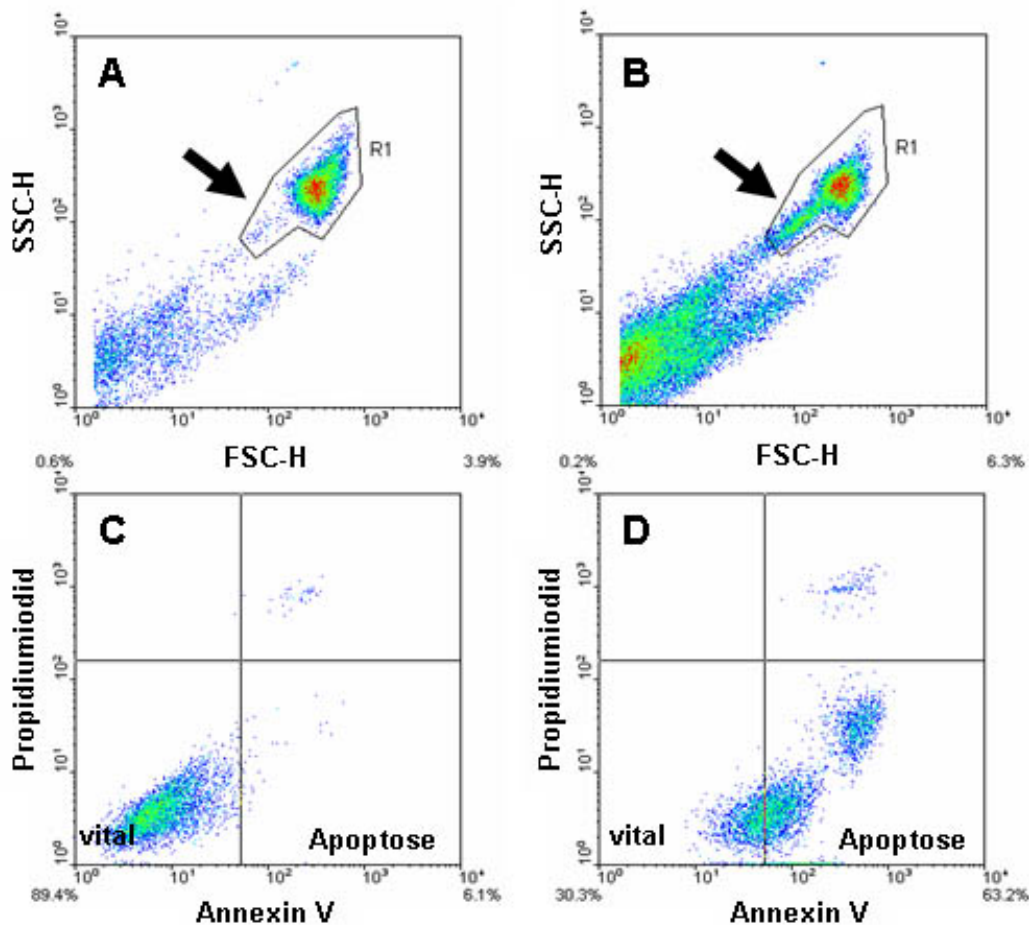


Abbildung 44. Untersuchung zur Apoptoseinduktion mittels Annexin V – Propidiumiodid Doppelfärbung. HL-1 Zellen wurden in serumfreiem Basalmedium ausgehungert und anschließend mit TNF- α (100 ng/mL) stimuliert. Der Nachweis der Apoptose erfolgte im Durchflusszytometer mittels gleichzeitiger Annexin V- und Propidiumiodid (PI)-Färbung. Zu sehen ist eine repräsentative Messung der Kontrollzellen mit dem leeren Expressionsplasmid. Unstimulierte Zellen zeigen in der SSC/FSC und Annexin V/PI (FL-1/FL-3) gut abgrenzbare Populationen (**A**, **C**). Nach Inkubation mit TNF- α für 17 Stunden kam es zu einer Apoptose-bedingten morphologischen Veränderungen der Zellen (Pfeile SSC/FSC); (**B**) und zu einer Zunahme der Annexin V-Bindung und PI-Färbung (**D**).

Ergebnisse

Die Zellen, in denen TF anhand eines pcDNA3.1-Expressionsvektors überexprimiert wurde, zeigten gegenüber den Kontrollen mit dem leeren Plasmid nach 17-stündiger TNF- α -Behandlung eine um etwa 50% reduzierte Apoptoserate (Abbildung 45; $26,42 \pm 3,98\%$ vs. $42,64 \pm 4,27\%$ für TNF- α 50 ng/mL, $P < 0,05$; und $25,98 \pm 1,69\%$ vs. $51,05 \pm 4,13\%$ für TNF- α 100 ng/mL, $P < 0,05$; TF-Überexpression vs. Kontrollen).

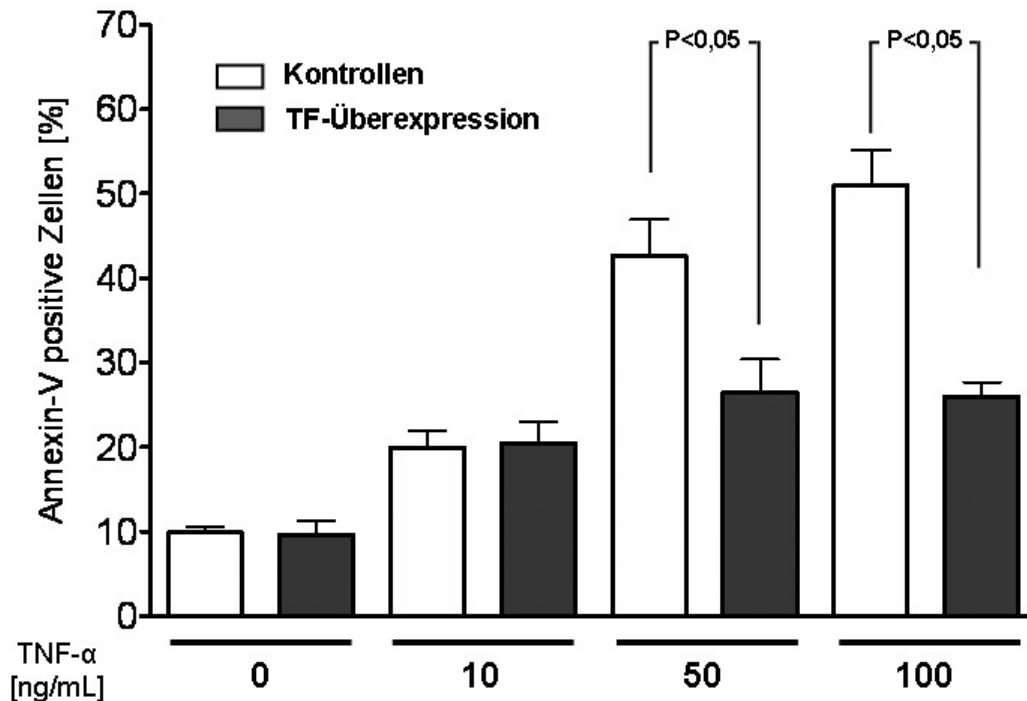


Abbildung 45. Einfluss der Tissue Factor-Expression auf das Apoptoseverhalten von HL-1 Kardiomyozyten nach Stimulation mit TNF- α . Stabil mit dem TF-Expressionsvektor und dem leeren Vektor transfizierte Zellen wurden generiert und nach Serumentzug für 17 Stunden mit unterschiedlichen TNF- α -Konzentrationen stimuliert. Die Apoptoserate der unterschiedlichen Zelllinien wurde mittels Annexin-V und Propidiumiodid Doppelfärbung im Durchflusszytometer bestimmt (4.13) ($N > 6$).

In dem nächsten Schritt wurde untersucht, ob eine verminderte TF-Expression der Kardiomyozyten ebenfalls eine erhöhte Apoptoserate nach TNF- α -Stimulation induziert. Zur Suppression der TF-Expression wurde eine stabil transfizierte HL-1 Zelllinie generiert, die einen shRNA-Expressionsvektor enthielt, bei dem mittels Tetrazyklin die shRNA-Expression induziert wurde. Durch die Expression der shRNA wurde die TF-Expression effizient herunterreguliert (Abbildung 42). Nach Serumentzug erfolgte die Stimulation dieser HL-1 Zellen mit den oben genannten TNF- α -Konzentrationen über Nacht und anschließend die Analyse der Apoptoserate.

Ergebnisse

Auch anhand des shRNA-vermitteltem *knock down* der TF-Genexpression (Abbildung 42) zeigte sich, dass das Apoptoseverhalten der Kardiomyozyten von der TF-Expression abhing (Abbildung 46). Die Zellen mit geringer TF-Expressionen verzeichneten verglichen mit den entsprechenden Kontrollen eine erhöhte TNF- α -induzierte Apoptoserate. Wie in Abbildung 46 dargestellt, sank die Anzahl der vitalen (Annexin V-negativen) Zellen nach Stimulation mit steigenden TNF- α -Konzentration bei Zellen mit verminderter TF-Expression ab ($46,68 \pm 1,79\%$ vs. $38,81 \pm 2,21\%$ für TNF- α 50 ng/mL, $P < 0,05$; und $42,87 \pm 0,98\%$ vs. $33,05 \pm 2,12\%$ für TNF- α 100 ng/mL, $P < 0,001$; Kontrollen vs. TF *knock down*).

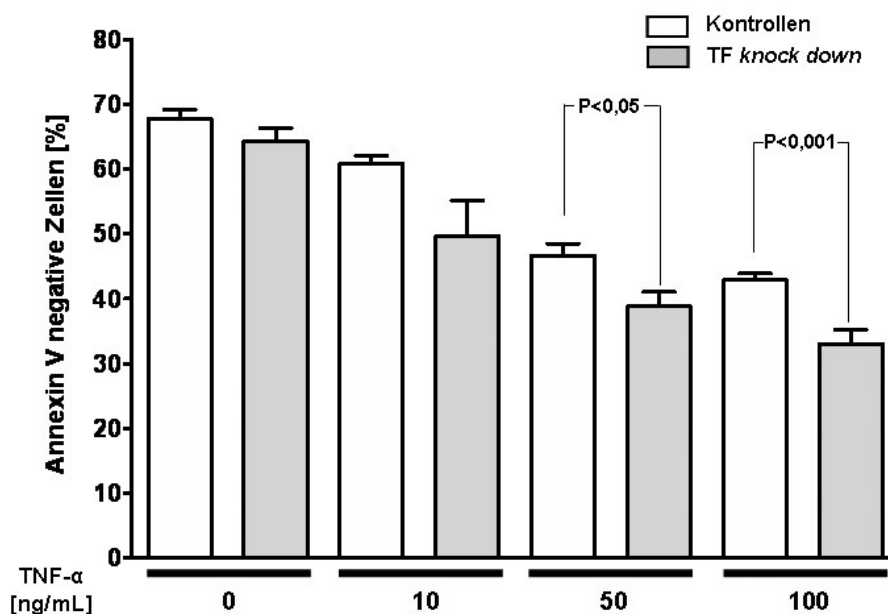


Abbildung 46. Einfluss des verringerten Tissue Factor-*knock downs* auf die Vitalität der Kardiomyozyten nach TNF- α -Stimulation. Eine stabil mit einem Tetrazyklin-regulierten shRNA-Expressionsvektor transfizierte Zelllinie, welcher gegen TF-gerichtete shRNA exprimiert, wurde verwendet. Die Zellen wurden nach Serumentzug für 17 Stunden mit unterschiedlichen TNF- α -Konzentrationen stimuliert. Der Apoptosegrad der unterschiedlichen Zelllinien wurde mittels Annexin-V und Propidiumiodid-Doppelfärbung im Durchflusszytometer bestimmt (4.13) (In Weiß: Zellen ohne Tetrazyklin; In grau: 24 h vor Serumentzug begann die tägliche Zugabe von Tetrazyklin (1 μ g/mL; Tet-On) ins Medium) (N>6).

Ergebnisse

Es wurde ferner untersucht, ob die TF-Expression neben ihren Einfluss auf die Zytokin-induzierte Apoptose auch unter einem anderen Stimulus eine protektive Wirkung auf die Überlebensfähigkeit der Zellen besitzt. Zum Verifizieren der anhand von TNF- α als Stimulus erhobenen Apoptosedaten, wurden die Zelllinien mit einer anderen bekannten Apoptose-induzierenden Substanz nämlich Camptothecin behandelt.

Nach Stimulation der Zellen mit 2 μ M Camptothecin über Nacht zeigte sich erneut, dass eine TF-Überexpression vor dem mit Camptothecin-induzierten Zelltod schützte (Abbildung 47).

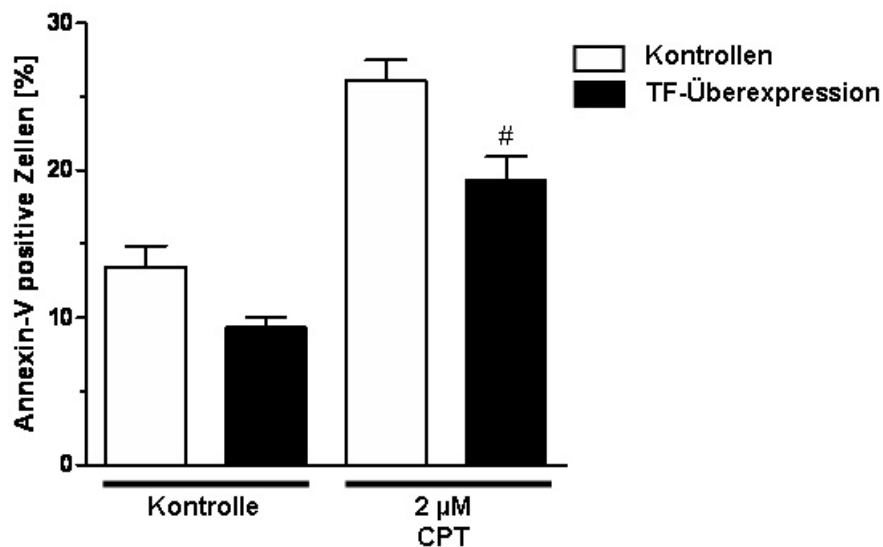


Abbildung 47. Camptothecin-induzierte Apoptose bei Kardiomyozyten. HL-1 Zellen mit unterschiedlichen TF-Expressionsniveaus (Kontrollzellen = weißer Balken; TF-Überexpression = schwarzer Balken) wurden mit 2 μ M Camptothecin (CPT) für 17 Stunden stimuliert und die Apoptoserate im Durchflusszytometer bestimmt (# P<0,05 CPT-stimulierte Kontrollen vs. CPT-stimulierte TF-überexprimierende Zellen; N>8).

Ergebnisse

Um festzustellen, ob der durch TF-vermittelte Apoptoseschutz über die Proteinkinase B (PKB/AKT) vermittelt wird, wurde In einem zweiten Versuchsansatz PKB/AKT inhibiert und die Zellen hinsichtlich ihres Apoptoseverhaltens erneut untersucht.

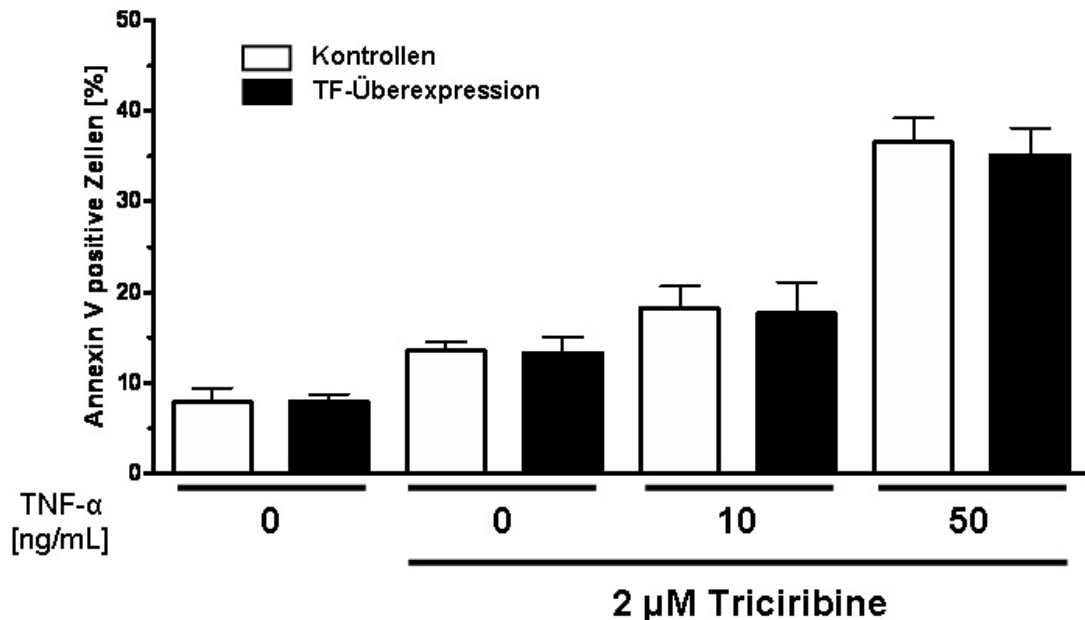


Abbildung 48. Effekte der AKT-Inhibierung auf das Apoptoseverhalten von TF-überexprimierenden HL-1 Zellen. Die verwendeten Zellen wurden 60 min vor TNF- α -Stimulation mit dem AKT-Inhibitor Triciribin (2 μ M) behandelt. Der Apoptosenachweis erfolgte 17 Stunden später im Durchflusszytometer mittels einer Annexin V/ Propidiumiodid-Färbung (in weiß: Kontrollvektor; in schwarz: TF-Expressionsvektor; N>4).

Die Inhibierung der intrazellulären PKB/AKT mit einem spezifischen Inhibitor (2 μ M Triciribine) führte zur vollständigen Aufhebung des anti-apoptotischen Effektes der TF-Überexpression nach TNF- α -Stimulation der HL-1 Kardiomyozyten (Abbildung 48).

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die TF-Überexpression über eine Aktivierung des PKB/AKT-Signalweges das zelluläre Überleben der Kardiomyozyten *in vitro* begünstigt

6 Diskussion

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse zeigten, dass die TF-Expression in Kardiomyozyten unter entzündlichen Bedingungen *in vivo* und *in vitro* ansteigt. Die Erhöhung der TF-Expression war mit einem Thromboserisiko (Fibrinablagerungen) *in vivo* und einer vermehrten zellulären Thrombogenität der Kardiomyozyten *in vitro* assoziiert. Ferner wurden Kardiomyozyten als Quelle von prokoagulanten Mikropartikeln identifiziert, die die Thrombogenität des Überstandes *in vitro* beeinflussen. Außerdem wurde nachgewiesen, dass die TF-Expression das Überleben der Kardiomyozyten unter inflammatorischen Bedingungen begünstigt.

6.1 Die Tissue Factor-Expression im mit CVB3-infizierten Herzen

Bisher lagen keine Daten vor, die einen Zusammenhang zwischen einer MC und einem erhöhten Thromboserisiko im Hinblick auf die myokardiale TF-Expression aufzeigten.

Eine virale MC wird oftmals mit einer CVB3-Infektion in Verbindung gebracht und führt letztendlich zur Entwicklung einer DCM (Kuhl et al., 2005). Die Virusinfektion des Herzens induziert die kardiomyozytäre Expression von inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , TNF- α und IL-6 *in vivo* (Abbildung 17) und *in vitro* (Dudding et al., 1989; Gosselin et al., 1992; Smith et al., 1992; Staats und Lausch, 1993). TNF- α spielt dabei besonders bei der Virusabwehr eine Rolle u.a. durch Induktion der Interferon-Expression (Kohase et al., 1986; Pavic et al., 1993). Ferner steigt die myokardiale TNF- α -Synthese als Reaktion auf myokardialen Stress, Druck- und Volumenbelastung (Kapadia et al., 1995; Li et al., 2000). Es wurde beobachtet, dass erhöhte myokardiale TNF- α -Spiegel zu akuter myokardialer Verletzung, ventrikulärer Dysfunktion und Endothelzerstörungen führen können (Haddy et al., 2003; Sun et al., 2004). Eingewanderte aktivierte T-Zellen, Endothelzellen und Kardiomyozyten gelten als potentielle Quelle für myokardiales TNF- α und andere pro-inflammatorische Zytokine (Bazzoni und Beutler, 1996). Patienten mit idiopathischer DCM und hohen myokardialen Entzündungswerten haben einen zweifach höheren TNF- α -Spiegel im Plasma als DCM-Patienten mit geringer myokardialer Entzündung (Sigusch et al., 2000).

In Tiermodellen wurde beobachtet, dass es in der akuten Phase einer viralen MC (7 Tage p.i.) zu einer Thrombusformation im Herzen kommen kann; die Inzidenz hierfür lag bei 14,3% (Tomioka et al., 1985). Daly et al. spricht sogar von einer Inzidenz von 25% bei Patienten mit akuter MC (Daly et al., 1983). In der vorliegenden Arbeit war schon vier Tage nach der CVB3-Infektion eine Ablagerung von Fibrin im Myokard nachweisbar (Abbildung 12). Fibrinablagerungen gelten als Marker einer aktivierten Koagulationskaskade. Die Verbindung von myokardialer Entzündung und Fibrinablagerung, die in dieser Arbeit beschrieben wurde, konnte ebenfalls von anderen Autoren beobachtet werden (Kitaura, 1981; Erlich et al., 2000). Kitaura et al. spekulierten jedoch, dass die Thromben eher durch aktivierte Plättchen, als durch eine vermehrte Fibrinogenbildung verursacht wurden (Kitaura, 1981). Dabei ist Fibrin für das Stabilisieren von reversibel aggregierten Plättchen unter hohen Blutfluss-geschwindigkeiten essentiell. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei der angewendeten Fibrinnachweismethode nicht auch Anteile von nicht-vernetzten Fibrin sowie dem Fibrin-Vorläuferprotein Fibrinogen detektiert wurden (Schnitt et al., 1993; Kishimoto et al., 1998). Die Ablagerungen von Fibrin innerhalb des entzündeten Myokards (Abbildung 12) und die erhöhte FVIIa-Bindekapazität in der Nähe von CD3⁺-Zellen (Abbildung 20) lassen vermuten, dass es während der akuten MC zu einer Dysregulation der kardialen Hämostase kommt, die zu einem erhöhten Thromboserisiko führt. Zellulärer TF kann in Abhängigkeit seiner Konformation als schwach-thrombogenes oder hoch-thrombogenes Protein vorliegen kann (Ahamed et al., 2006; Versteeg und Ruf, 2007). Es ist daher möglich, dass die Mehrzahl der TF-Proteine in der schwach-thrombogenen Form vorhanden ist und deren Aktivierung durch pathologische Veränderungen (wie z.B. Entzündung) im Myokard vermittelt wird. In dieser Arbeit wurde aktiver TF in direkter Nähe zu Infiltraten beobachtet (Abbildung 18 und 20). Im Ischämie/Reperfusion (I/R)-Modell von Ehrlich et al. zeigte sich eine gesteigerte TF-Expression und -Aktivität, die zu einer extravaskulären Fibrinogenbildung im myokardialen Muskel führte (Erlich et al., 2000). Die Autoren vermuteten, dass extravaskulärer TF eine entzündungsfördernde Rolle spielt, indem er die Bildung von Thrombin an TF-positiven Kardiomyozyten begünstigt und dadurch die Zytokin-Expression erhöht und die Leukozyteninfiltration fördert (Erlich et al., 2000). Das Vorkommen von myokardialen Fibrinablagerungen wurde mit einem entzündungsbedingtem Verletzen des Endothels erklärt (Erlich et al., 2000). Dadurch ist es den Koagulationsproteasen des Plasmas möglich, mit

Diskussion

kardiomyozytärem TF zu interagieren, der dann extravaskulär die Gerinnung initiiert. Tomioka und Mitarbeiter beobachteten, dass sich während der murinen MC Thromben an Stellen der endokardialen Läsionen bildeten (Abbildung 49). In der direkten Nachbarschaft dieser Thromben waren tote Myozyten und zelluläre Infiltrate nachweisbar (Tomioka et al., 1986). In der vorliegenden Arbeit wurde eine erhöhte TF-Expression im Endo- und Myokard in enger Nähe zu Infiltraten nach viraler Infektion beobachtet (Abbildung 16). Dieser Befund wird durch die deskriptive klinische Studie von Nakamura et al. bestätigt, die eine vermehrte TF-Expression in der endokardialen Schicht in direkter Nähe zu Infiltraten nachwies. Die TF-Proteinexpression war bei diesen Patienten mit kardiogenen Thromboembolien assoziiert (Nakamura et al., 2003). Der Verschluss von myokardialen Mikrogefäßen durch Thromben kann des Weiteren zu einem Fortschreiten der myokardialen Verletzung und Dysfunktion aufgrund einer Ischämie führen (Sharpe, 1992; Sole und Liu, 1993).



Abbildung 49. Ventrikulärer Thrombus im murinen viralen Myokarditismodell. Der Thrombus formierte sich 10 Tage nach Virusinfektion an Stellen mit endokardialer Verletzung (Pfeilköpfe). Die genaue Grenze zwischen Endokard und Thrombus war nicht eindeutig bestimmbar. Zu sehen ist eine Hämatoxylin-Eosin Färbung (Tomioka et al., 1986).

Die Ergebnisse der hämodynamischen Messung der Maus Herzen zeigten, dass die LVEF und Druck/Zeit-Parameter während des Krankheitsverlaufs der MC signifikant verschlechtert waren (Tabelle 11). Jedoch wurde keine Veränderung der enddiastolischen Volumen beobachtet (Tabelle 11). Eine starke Einschränkung der

systolischen Funktion war ab Tag 4 p.i. messbar. Im Gegensatz dazu stieg die TF-Expression erst an Tag 8 p.i., was mit Fibrinablagerungen verbunden war. Somit lässt sich vermuten, dass im Hinblick auf die akute Phase der MC kein Zusammenhang zwischen der TF-Expression, der Fibrinablagerung und der hämodynamischen Funktion vorliegt. Diese Daten entsprechen den Beobachtungen von Tomioka und Kollegen, die ein erhöhtes Thromboserisiko ohne nennenswerte Vergrößerung der Ventrikel beschrieben (Tomioka et al., 1985). Die rheologischen Veränderungen, bedingt durch die myokardialen Entzündung, haben nur eine untergeordnete Bedeutung.

Monaco et al. beobachteten in einem *in vitro*-System, dass aktivierte CD3⁺-Zellen Endothelzellen zur Produktion von TF und pro-inflammatorischen Zytokinen anregten (Monaco et al., 2002). Diese Daten sind vergleichbar mit den Daten in dieser Arbeit. Die TF-Expression und -Aktivität korrelierte und ko-lokalisierte positiv mit den CD3⁺-Zellen. Ferner weisen CD3⁺-Zellen kardiotoxische Eigenschaften auf. Diese Eigenschaften führen zur Apoptose von Kardiomyozyten im murinen MC-Modell (Huber, 2000). Es wurde in dieser Arbeit beobachtet, dass die Induktion von myokardialen TF und die erhöhte FVIIa-Bindekapazität mit der in direkter Nähe befindlichen CD3⁺- und MAC3⁺-Infiltraten assoziiert war. Diese Infiltrate korrelierten positiv mit der myokardialen Expression von entzündungsfördernden Zytokinen. Zusammenfassend lässt dies auf eine Zytokin-induzierte TF-Expression bei der viralen MC schließen.

Die TF-getriggerte Koagulation wird durch TFPI-1 reguliert. TFPI-1 hat im Herzen im Besonderen während der Entzündungsreaktion verschiedene Funktionen. Verschiedene Autoren vermuteten, dass TFPI-1 die Bildung von Thrombin und somit die Fibrinablagerung unterbindet und dadurch die Chemotaxis der Leukozyten verhindert und die pro-inflammatorischen und proliferativen Signale durch Thrombin abschwächt (Jang et al., 1995; Oltrona et al., 1997). Während die TF-Expression nach Infektion anstieg, blieb die Expression vom spezifischen Inhibitor (TFPI-1) unverändert (Abbildung 15). Diese Beobachtung bestätigten die schon erwähnten humanen Daten von Nakamura et al. (Nakamura et al., 2003). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass nach Zugabe von TNF- α die TFPI-1-Expression *in vivo* sogar herunter reguliert wurde (Shimokawa et al., 2000). *In vitro* sank die TFPI-1-mRNA-Expression der Kardiomyozyten nach Inkubation mit TNF- α (Abbildung 31). Ebenso ergab sich, dass die TFPI-Aktivität und -Expression in

Patienten mit akuten ischämischen Schlaganfall, im Gegensatz zu den TF-Spiegeln, eher abfällt (He et al., 2002). Ferner verliert TFPI-1 an Aktivität, wenn es durch Proteasen von Makrophagen gespalten wird (Belaouaj et al., 2000). Die Ko-Lokalisation von aktivem TF und zellulären Infiltraten stimmten mit dieser Beobachtung überein. Die Erhöhung der TF-Expression und die bekannte TFPI-1-Geninaktivierung bzw. -Aktivitätsinhibierung begünstigt die Fibrinablagerung im Myokard und die lokale Thrombogenität des Gewebes steigt, was letztendlich in einer erhöhten Inzidenz thrombotische Ereignisse mündet.

In der Fachliteratur wird spekuliert, dass der Hauptgrund für den plötzlichen Tod von Patienten mit einer Herzinsuffizienz nicht Arrhythmien, sondern thrombotische Gefäßverschlüsse sind (Narang et al., 1996). Bei Patienten mit Herzinsuffizienz wurden erhöhte zirkulierende TF-Spiegel gemessen, die als unabhängige Prädiktoren für eine erhöhte Mortalität angesehen werden (Soejima et al., 1999; Chin et al., 2003). Die mögliche Freisetzung von prokoagulativen TF aus dem entzündeten Herzen ins zirkulierende Blut wurde von verschiedenen Autoren angenommen (Mallat et al., 2000; Armaganian et al., 2000). CVB3-infizierte Myozyten zeigten eine dramatische Zerstörung der zytoskelettalen Architektur. Während dieser Myozytolyse kommt es zur Auflösung der Myofibrillen, zur Zerstörung der Plasmamembran und zur Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln und myozytären Proteinen (Saraste et al., 2003). An Epithelzellen zeigte sich, dass eine Zerstörung des Zytoskeletts die Zellen in einen prokoagulanten Zustand versetzt, der durch Induktion der zellulären TF-Expression entsteht (Milsom und Rak, 2005). Der sterbende Kardiomyozyt wurde als Quelle für TF-positive apoptotische Körperchen oder MP vermutet, was ebenfalls zu einer Erhöhung der Plasmathrombogenität beiträgt (Erlich et al., 2000; Beranek, 2002). Allerdings verursacht eine CVB3-Infektion auch eine starke Entzündung des Pankreas und der Leber, beides ist mit einer vermehrten TF-Proteinkonzentration im Plasma assoziiert (Wessely et al., 2001; Sawa et al., 2006). Weiterhin geraten Endothelzellen als Reaktion auf eine Zytokin-Stimulation oder direkte Virusinfektion in einen thrombogenen Zustand (Key et al., 1993; Esmon, 2004; Szotowski et al., 2005a). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Aktivierung von Endothelzellen (VCAM-1-Expression; Abbildung 20) und eine erhöhte Plasmathrombogenität ab Tag 4 p.i. (Abbildung 21) als Reaktion auf die CVB3-Infektion festgestellt. Somit nehmen wir an, dass die während einer MC beobachtete erhöhte TF-Aktivität im zirkulierenden

Blut durch aktivierte Endothelzellen, entzündete Kardiomyozyten, aber auch andere infizierte Organen bedingt wird. Die gemessene TF-Aktivität im Plasma (Abbildung 21) und die Aktivierung des Endothels (Abbildung 20) weisen auf eine systemische Thrombogenitätserhöhung im Verlauf der CVB3-MC hin. Außerdem demonstrierten wir bei Patienten mit akuter myokardialer Entzündungsreaktion eine Korrelation zwischen der TF-Expression und der Endothelaktivierung im Myokard (Abbildung 25). Anhand der vorliegenden Daten kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Faktoren neben der Plasma-TF-Konzentrationserhöhung das Risiko der Thrombusentstehung beeinflussten. Eine myokardiale Entzündung erhöht das Thromboserisiko nicht nur durch eine gesteigerte TF-Expression, sondern auch durch eine Dysregulation von anderen plasmatischen Gerinnungsproteinen, die die Thrombogenität beeinflussen.

Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass eine viral-bedingte MC das Blutgerinnungssystem aktiviert. Die Aktivierung ist verbunden mit einer erhöhten myokardialen TF-Expression und -Aktivität. Erhöhte TF-Thrombogenität wurde ebenfalls im Blut gefunden, die möglicherweise zu einer systemischen Thrombusformation in der akuten Phase der MC führt. Die publizierten Daten von Szotowski et al. (Szotowski et al., 2005b) und die hier vorliegenden Beobachtungen lassen darauf schließen, dass nur eine akute und nicht die chronische Entzündung des Herzens mit einer erhöhten TF-Expression assoziiert ist. Die Bildung von Thromben während der myokardialen Entzündung und der Herzinsuffizienz ist ein multifaktoraler Prozess. Bekanntlich tragen auch eine gesteigerte Plättchen- und Endothelaktivierung sowie eine vermehrte Stasis des Blutes im hypokinetischen Ventrikel hierzu bei. Die vorliegenden Daten zeigen aber auch, dass die entzündungsbedingte vermehrte TF-Expression einen bedeutenden Anteil an der Thrombusentstehung während einer MC hat.

6.2 Die Tissue Factor-Expression im entzündeten humanen Herzen

Eine verminderte TF-Expression in EMBs von Patienten mit einer diagnostizierten chronischen DCM ohne Nachweis einer myokardialen Entzündung wurde kürzlich von unserer Arbeitsgruppe beschrieben (Szotowski et al., 2005b). Diese Beobachtung stimmt mit den Daten in dieser Arbeit überein. Bei Patienten mit vermuteter akuter MC bzw. inflammatorischer CM wurde ebenfalls eine signifikant verminderte TF-Expression in den EMBs gemessen (Abbildung 23). Diese Beobachtung wurde auf mRNA-Level am ABY-MC-Modell verifiziert. Während der frühen Phase der myokardialen Entzündung steigt die TF-mRNA-Expression im Herzen signifikant an und sinkt dann auf 66% der Kontrollen ab (Abbildung 14).

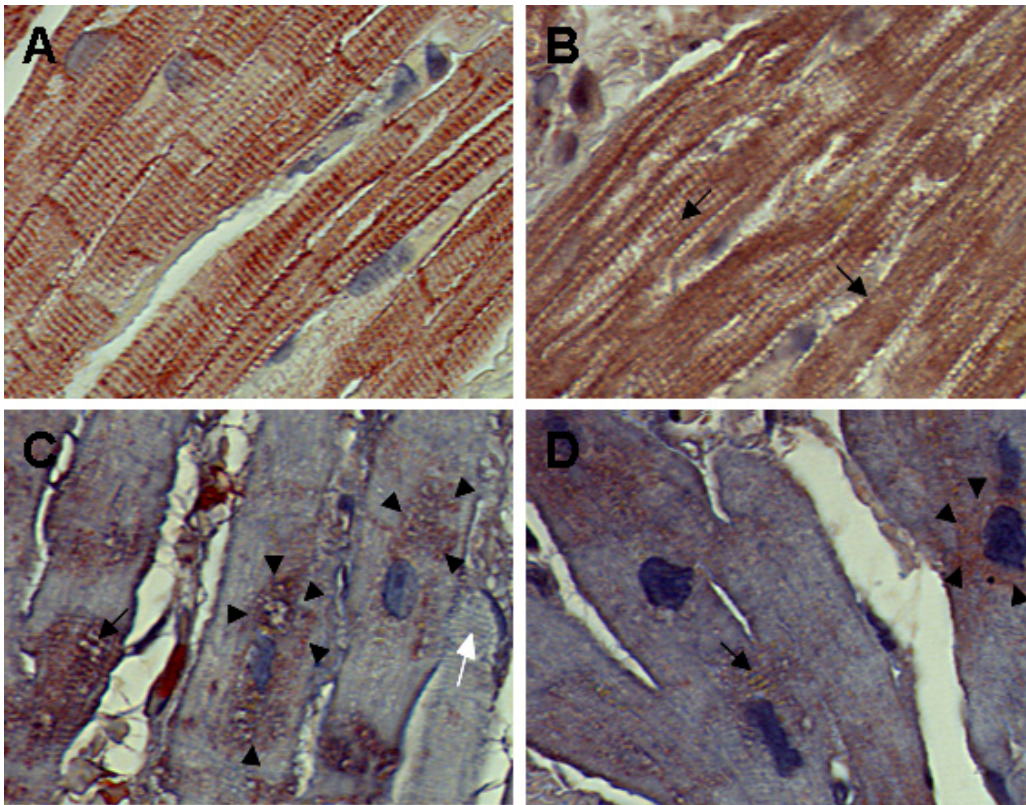


Abbildung 50. Zelluläre Lokalisation von Desmin und Tissue Factor im humanen Myokard. Endomyokardbiopsien von Patienten mit normaler Pumpfunktion (EF=64%; **A-B**) und eingeschränkter Pumpfunktion aufgrund einer DCM (EF=21%; **C-D**) wurden für Desmin (**A**) und TF (**B-D**) gefärbt. **A.** Die immunhistologische Färbung zeigt eine gleichmäßige Verteilung von Desmin in den Z-Bändern und der *Disci intercalati*. Die Z-Banden und das Sarkolemm desselben Patienten waren ebenfalls positiv für TF (Pfeile, **B**). Im Myokard von Patienten mit schlechter Pumpfunktion (**C-D**) kommt es zu einem schwachen (schwarze Pfeile) bis fehlenden Anfärben (weißer Pfeil) der Z-Bänder für TF. Der Nachweis für TF war nur im kernnahen Plasma (Pfeilspitzen, **C-D**) möglich (Originalvergrößerung 630x) (verändert nach Szotowski et al., 2005b).

TF ko-lokalisiert im gesunden Herzen innerhalb der Kardiomyozyten mit den Strukturproteinen Desmin (Abbildung 50 A und B) und Vinculin. Es ist in den Z-Bändern sowie den myozytären Kontaktstellen nachweisbar (Drake et al., 1989; Fleck et al., 1990). *In vitro*-Versuche zeigten, dass die zytoplasmatische Domäne von TF über Filamin A mit dem Aktin-Zytoskelett interagiert und dadurch die Kontraktionsfähigkeit der Zellen beeinflussen kann. Die Autoren zeigten, dass die Phosphorylierung von Ser₂₅₃ und Ser₂₅₈ für diese Interaktion essentiell ist (Ott et al., 1998). Auch eine Komplexbildung von TF mit seinem Liganden FVII/FVIIa hat einen direkten Einfluss auf das Zytoskelett (Versteeg et al., 2000). FVIIa kann selbst bei bestehender vaskulärer Integrität extravaskulär an TF gebunden vorliegen (Hoffman et al., 2007). Anhand dieses Befundes könnte man auf eine ständige extravaskuläre TF-vermittelte Signaltransduktion durch die Bindung von FVIIa schließen.

TF interagiert auch mit TFPI-1, welcher ebenfalls von Kardiomyozyten exprimiert wird (Kereveur et al., 2001). TFPI-1 kann über Glukosamine (z.B. Syndecan 4) an der Zelloberfläche gebunden vorliegen und stabilisiert dadurch die Zellstruktur (Novotny et al., 1989; Sandset, 1996; Kojima et al., 1996). Syndecan 4 ist ein Bestandteil der fokalen, zellulären Kontaktstellen und ist wichtig für die Stressfaserbildung der Zellen, wenn diese sich an Fibronectin binden (Couchman und Woods, 1996). Die Komplexbildung von TF, TFPI-1 mit nachfolgender Interaktion mit Syndecan 4 verändert möglicherweise die Syndecan 4-Lokalisation und dadurch dessen Integrin-Funktion. Beobachtungen in klinischen und in tierexperimentellen Studien ließen den Schluss zu, dass Defekte an Adapterproteinen und im Zytoskelett die kardiale Dilatation und somit eine Herzinsuffizienz-Entstehung begünstigen (Towbin, 1998).

Im insuffizienten humanen Herzen wurden verminderte TF-Expressionsspiegel beobachtet (Luther et al., 2000). Luther et al. postulierte für TF eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität und Funktion des Myokards, da die TF-Expression positiv mit der Anzahl der kardiomyozytären Kontaktstellen im Myokard korrelierte (Luther et al., 2000). Diese Hypothese wird durch die publizierten Ergebnisse von Szotowski et al. unterstützt. Wir beobachteten eine positive Assoziation von Pumpfunktion und myokardialer TF-Expression bei Patienten mit chronischer DCM (Szotowski et al., 2005b). Ferner zeigte sich, dass es neben der Reduktion der TF-Expression auch zu einer zellulären Umverteilung vom TF-Protein kommt (Abbildung 50). TF war nicht mehr ausschließlich in den Z-Bändern zu finden,

sondern lag vielmehr diffus bzw. in direkter Nähe zum Zellkern vor (Abbildung 50). Es wurde spekuliert, dass diese Umverteilung ebenfalls zu einer Verschlechterung der kardialen Pumpfunktion und zur ventrikulären Dilatation beitragen (Szotowski et al., 2005b). In der vorliegenden Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen der TF-Expression und der ventrikulären Funktion bzw. Dilatation hergestellt werden. Der Grund dafür ist das hinsichtlich der EF sehr homogene Patientenkollektiv. Die Streuung der EF der Patienten war in dieser Studie sehr klein, sodass sich eine Korrelation zwischen der TF-Expression mit der Pumpfunktion nicht ergab (Tabelle 12). Die Studie von Szotowski et al. beinhaltete ein Patientenkollektiv mit einem großen Spektrum unterschiedlicher Herzfunktionsparameter. Es gab eine Subgruppe mit extrem eingeschränkter Pumpfunktion und eine mit guter Pumpfunktion (Szotowski et al., 2005b). Ob die verminderte TF-Expression im Myokard möglicherweise die Pathogenese der myokardialen Dysfunktion unter entzündlichen Bedingungen erklärt, ist bislang nicht ausreichend erforscht.

Ferner stellte sich in dieser Arbeit keine Assoziation zwischen der TF-Expression und dem Virusnachweis in den EMBs dar (Abbildung 24). Eine virale Infektion kann eine myokardiale Entzündung und nachfolgend eine DCM-Entwicklung begünstigen (Pauschinger et al., 1999; Liu und Mason, 2001; Kuhl et al., 2005). Da die initiale Infektion meist unerkannt und unsymptomatisch verläuft, muss davon ausgegangen werden, dass sich die untersuchten Patienten oft in der mittleren bis späten Phase der DCM-Progression mit den bekannten klinischen Symptomen wie Dyspnoebeschwerden und eingeschränkter ventrikulärer Pumpfunktion befinden (Abbildung 6). Im hier untersuchten Kollektiv war der Anteil an viruspositiven Nachweisen jedoch hoch (Abbildung 22 und 24). Alle Patienten wurden im Krankheitsverlauf früh biopsiert. Die Anamnese (virale Infektion in den letzten sechs Wochen) und akute Beschwerden, wie Dyspnoe, *Angina pectoris* und Palpitationen, bei den Patienten ließen den Verdacht auf eine virale Infektion des Herzens zu (Tabelle 12). Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass sich diese Patienten sich in einem Frühstadium der inflammatorischen CM befanden. Die nur mäßig eingeschränkten Herzfunktionsparameter in Tabelle 12 deuten ebenfalls auf eine frühe Phase der MC hin, da sie sich nicht signifikant von den Messwerten der Kontrollen unterschieden.

Stellt man die TF-Expression mit der Expression von CD62E aus derselben EMB gegenüber, so besteht bei diesen beiden Messwerten eine signifikante Korrelation

(Abbildung 25). Bei der Studie von Nakamura et al. wurde ebenfalls beobachtet, dass die TF-Expression mit einer Aktivierung des Endothels im Myokard von MC-Patienten assoziiert war (Nakamura et al., 2003). Vergleicht man humane Studien mit Tiermodellen, so zeigt sich, dass retrospektiv der Infektionszeitpunkt beim Menschen nicht genau bestimmt werden kann. Ferner ist der Krankheitsverlauf bei Menschen selten zwischen akuter und chronischer Phase trennbar (Abbildung 6), wenn die betreffenden Patienten eine virale Infektion in der Vergangenheit hatten. Diese Limitationen können – in Teilen – erklären, wie es zu den Unterschieden zwischen klinischen und tierexperimentellen Studien kommt.

In den untersuchten Biopsien wurde des Weiteren eine starke Korrelation zwischen TF und einigen Fibrose- bzw. Remodellingmarkern festgestellt (Abbildung 26). Kardiale Fibrose ist durch einen pathologischen Umbau der extrazellulären Matrix (ECM) charakterisiert, welche eine Dysfunktion des insuffizienten Herzen verursacht (Weber et al., 1992). Verschiedene Studien zeigten die Rolle der Matrixmetalloproteasen (MMP) und deren Inhibitoren (TIMP) im myokardialen Matrixumbau und beim Erhalt der myokardialen Struktur auf (Vanhoutte et al., 2006). Der ECM-Umbau, das pathologische Remodelling und das Voranschreiten der Fibrose im Herzen werden durch das komplexe Zusammenspiel der MMP, TIMP und deren Regulatoren bestimmt. Verschiedene Autoren vermuteten, dass TF einen Einfluss auf die Expression und Aktivität von verschiedenen MMPs und TIMPs und somit auf den Matrixumbau im Herzen besitzt (Davis et al., 2007). So erhöht die TF/FVIIa-vermittelte Signaltransduktion die VEGF-Expression in Fibroblasten (Ollivier et al., 2000). Diese reguliert nachfolgend die Transkription der Gene für MMPs (Clauss et al., 1996; Wang und Keiser, 1998) und TIMPs (Lamoreaux et al., 1998). Ferner kann TF über die Bildung von Thrombin und die anschließende PAR-1-Aktivierung den ECM-Umbau beeinflussen (Davis und Erlich, 2008).

Wie in Abbildung 26 ersichtlich, wurde eine positive Assoziation von TF mit der Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA)-Expression gefunden. UPA ist in der Lage, MMPs zu aktivieren und ist zudem beim Gewebsumbau involviert. Ferner wird Plasminogen durch uPA in biologisch aktives Plasmin prozessiert, welches aktiv in den ECM-Umbau eingreift (Carmeliet und Collen, 1998). Eine Reduzierung der uPA-Expression verminderte die ventrikuläre Dilatation und kardiale Fibrose, die gewöhnlich auf eine virale MC folgen (Heymans et al., 2006). Die Wirkung von uPA

in der Progression der kardialen Fibrose verläuft hauptsächlich über Plasminogen und nicht über den uPA-Rezeptor. Eine Deletion vom uPA-Rezeptor hatte keinen Einfluss auf den myokardialen ECM-Umbau (Stempien-Otero et al., 2006).

Innerhalb der untersuchten Biopsien korrelierten außerdem die Expressionen von TF und CYR61 (Abbildung 26). Wir zeigten kürzlich, dass die CYR61-Expression im Myokard von Patienten mit DCM reguliert wurde (Wittchen et al., 2007). Der aktive TF/FVIIa-Komplex erhöht die CYR61-Expression in Fibroblasten *in vitro* (Pendurthi et al., 2000). CYR61 vermittelt innerhalb des Myokards die zelluläre Adhäsion und Migration. Es wurde weiterhin beschrieben, dass CYR61 Apoptose in Fibroblasten und virusinfizierten Zellen induziert (Kim et al., 2004; Nguyen et al., 2006). Man vermutete, dass eine transiente CYR61-Expression unter bestimmten Bedingungen einen positiven Effekt auf das Herz besitzt (Wittchen et al., 2007).

Kardiale Fibrose ist weiterhin mit der gesteigerten Synthese von unterschiedlichen Kollagen-Subtypen assoziiert. In dieser Arbeit zeigte sich eine signifikante Korrelation von TF mit Kollagen IV und eine tendenzielle Korrelation von TF mit Kollagen I (Abbildung 26). Kollagen IV ist integraler Bestandteil der zellulären Basalmembran und umgibt vitale Kardiomyozyten. Bei einem Verlust von vitalen Kardiomyozyten aufgrund eines Infarktes kommt es zu einer verminderten myokardialen Kollagen IV-Expression (Ishikawa et al., 2003). Tierversuche zeigten, dass die TF-Expression mit der Synthese von u.a. Kollagen I assoziiert ist (Davis et al., 2007).

Aufgrund von Tierversuchen nahmen verschiedene Autoren an, dass TF über eine Modulation der Endothelfunktion Einfluss auf die myokardiale Fibrose besitzt. Wie schon erwähnt, kann TF über seine vermittelte Signaltransduktion die VEGF-Expression und somit die Kapillardichte im Muskel beeinflussen (Poulsen et al., 1998; Ollivier et al., 2000). Studien mit LowTF Mäusen zeigten, dass die myokardiale Fibrose über eine verminderte Thrombinproduktion verursacht wurde (Davis et al., 2007). Eine reduzierte TF-Expression sowie die verminderte Thrombingeneration könnten in einer dysregulierten Expression von angiogenetischen Faktoren münden und dadurch die fibrotische Progression begünstigen.

Anhand der vorliegenden Daten lässt sich folgern, dass TF einen Einfluss auf die extrazelluläre Matrix und myokardiale Struktur über die Steuerung der Expression von Fibrose-assoziierten Genen wie TIMP, uPA, CYR61 und Kollagen-Subtypen besitzt.

6.3 Die transkriptionelle Regulation der Tissue Factor-Expression im Kardiomyozyten

Der Einfluss von pro-inflammatorischen Zytokinen auf die TF-Expression ist gut untersucht (Szotowski et al., 2006; Szotowski et al., 2007; Goldin-Lang et al., 2007). Bajaj et al. beobachteten, dass eine Stimulation mit Serum die TF-mRNA-Expression in Kardiomyozyten erhöht (Bajaj et al., 1999). Ein Anstieg der myokardialen TF-Expression durch *de novo* Synthese als auch eine erhöhte TF-Aktivität durch Deenkryption von existierenden TF wurde in einem kardialen I/R Modell beobachtet (Erllich et al., 2000). Wie schon in Abschnitt 6.1 beschrieben, waren im MC-Modell erhöhte myokardiale TF-Level nachweisbar, die mit der Expression von inflammatorischen Zytokinen korrelierten. Im Gegensatz zu anderen kardiovaskulären Zellen reagieren Kardiomyozyten nach LPS-Stimulation mit einer Senkung der TF-mRNA-Expression innerhalb der ersten acht Stunden (Mackman et al., 1993). Wir beobachteten ebenfalls eine verminderte TF-Expression in EMB von Patienten mit chronischer DCM (Szotowski et al., 2005b) und bei Patienten mit akuter MC bzw. inflammatorischer CM (Abbildung 23). Die Daten lassen vermuten, dass der kardiomyozytäre TF-Promoter auf verschiedene Stimuli unterschiedlich ansprechbar ist.

Bislang ist die transkriptionelle Regulation der kardiomyozytären TF-Promoteraktivität nicht geklärt. Der TF-Promoter besteht aus zwei regulatorischen Elementen (Abbildung 3). Die Aktivität des Promoters wird u.a. durch AP-1, Sp1, Egr-1 und NF κ B reguliert. Durch eine Inhibierung von NF κ B und den MAP-Kinasen p38, ERK1/2 und JNK in Endothelzellen und Leukozyten wurde eine Reduktion der Zytokin-vermittelten TF-Genexpressionserhöhung beobachtet (Guha und Mackman, 2001; Steffel et al., 2005). In dieser Arbeit wurde untersucht, welche MAP-Kinasen bei der Regulation der kardiomyozytären TF-Expression involviert sind. Nur die Hemmung von JNK führte zu einer signifikant reduzierten TF-Genexpression unter Basalbedingungen (Abbildung 29 und 33). Für den JNK-Signalweg wurde beschrieben, dass er zur konstitutiven und induzierten TF-Expression durch AP-1-Phosphorylierung in monozytären Zellen beiträgt (Hall et al., 1999). Des Weiteren wurde in dieser Arbeit beschrieben, dass die TF-Expression im Myokard von Patienten mit einer myokardialen Entzündung mit der Expression von AP-1, JNK und p38 positiv korrelierte (Abbildung 27). Die hier gemessenen *in vitro*- und *in vivo*-Daten lassen nun den Schluss zu, dass die myokardiale

Diskussion

TF-Expression über JNK, und nachfolgend über AP-1, mit möglicher Unterstützung von p38 reguliert wird.

Eine Aktivierung des JNK-Pathways wurde mit einem verbesserten Überleben von Kardiomyozyten in Verbindung gebracht (Engelbrecht et al., 2004). Die verwendete TNF- α -Konzentration von 10 ng/mL induziert bei Kardiomyozyten den programmierten Zelltod (Apoptose) (Klein et al., 2002). Die Apoptoseinduktion wurde auch anhand von aktivierter Caspase 3 nachgewiesen (Abbildung 33). Zellen schnüren, in Folge von Aktivierung und Apoptose, Membranfragmente (MP) ab (Szotowski et al., 2005a).

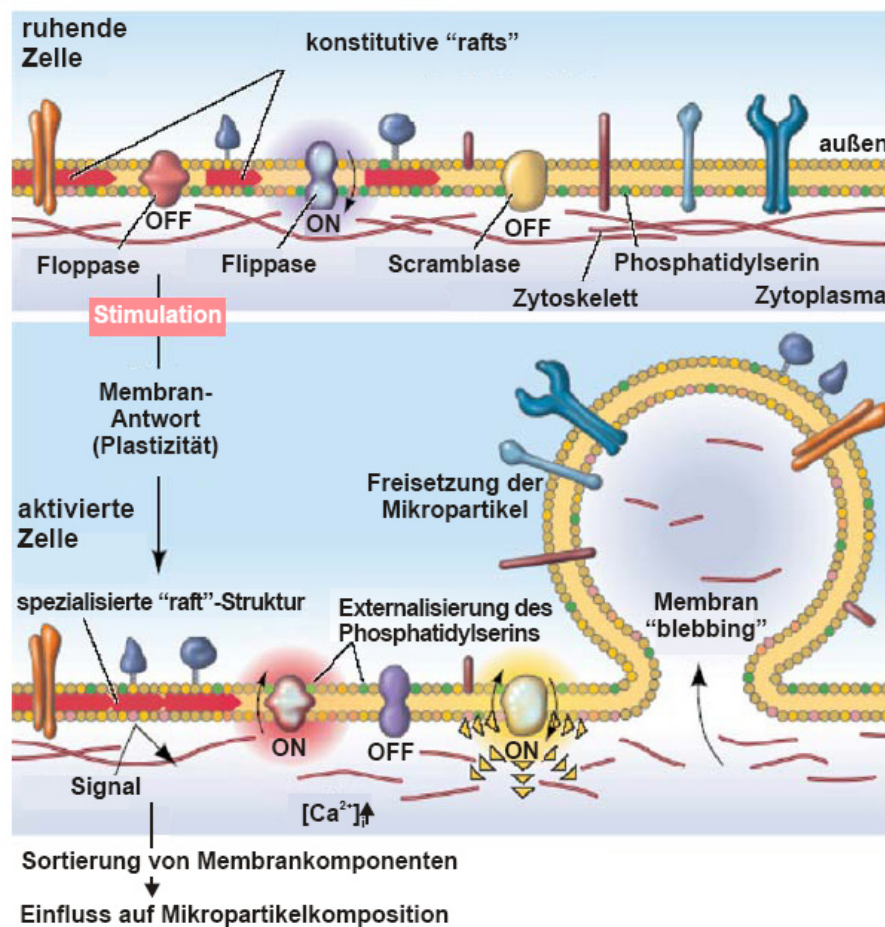


Abbildung 51. Reaktion der Plasmamembran auf eine Zellaktivierung. Die äußere Membran von eukaryotischen Zellen zeigt stark strukturierten Zonen (u.a. rafts) und eine Asymmetrie zwischen der Außen- und Innenseite der Membran auf. Nach Stimulation kommt es zum Umbau- bzw. Umstrukturierung der Membran, die besondere raft-Strukturen bilden sich, Phosphatidylserine gelangen an der Außenseite und Membranfragmente (Mikropartikel) werden abgeschnürt (modifiziert nach Hugel et al., 2005).

Ferner zeigte sich, dass native Kardiomyozyten nach Stimulation MP (Abbildung 52) freisetzen (Takemura et al., 2001). Die Inhibition des JNK-Signalweges in den Kardiomyozyten resultierte in einem starken Anstieg der kardiomyozytären MP-Freisetzung, diese war mit einer erhöhten ROK-Aktivierung (Abbildung 37) und Aktin-Streßfaser-Generation (Abbildung 39) verbunden. Die Freisetzung von MP ist mit einer gesteigerten RhoA-Aktivität und einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts assoziiert (Torgerson und McNiven, 1998; Sapet et al., 2006). ROK wird besonders durch aktive Caspase 3 aktiviert (Coleman et al., 2001). Die beteiligten intrazellulären Signalwege innerhalb von Kardiomyozyten, die zu einer RhoA-Aktivierung durch JNK-Inhibierung führen, sind jedoch bislang unerforscht. Es ist bekannt, dass eine JNK-Inhibierung zur Caspasen-Aktivierung in Myozyten und nachfolgend zu einer erhöhten ROK-vermittelten MP-Generation führt (Sebbagh et al., 2001; Tran et al., 2007).

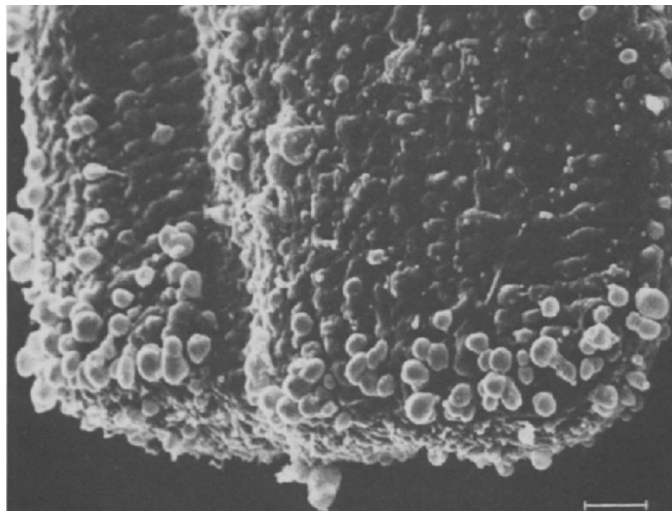


Abbildung 52. Kardiomyozyten bilden unter pathologischen Bedingungen wie Anoxie *in vitro* Membranblasen. Details von einem Kardiomyozyten nach 30 min Anoxia. Auf der elektronenmikroskopischen Aufnahme sind nahe der *Disci intercalati* zahlreiche Membranblasen zu erkennen (Piper et al., 1984) (Balken = 2µm).

Erhöhte Plasmaspiegel an kardiomyozytären Proteinen und thrombogenen MP wurden im extrazellulären Raum des Herzens von Patienten mit unterschiedlichen Herzerkrankungen gefunden (Missov und Mair, 1999; Mallat et al., 2000; Morel et al., 2005; Leroyer et al., 2007). Gesteigerte Spiegel an zirkulierendem TF erhöhten das Risiko für thrombotische Komplikationen und führten zu einer erhöhten Mortalität bei diesen Patienten (Soejima et al., 1999; Sambola et al., 2003; Chin et al., 2003).

Das entzündungsfördernde Zytokin TNF- α wird mit Gefäßverletzungen und einer Erhöhung der endothelialen Permeabilität sowohl unter akuten als auch chronischen Entzündungsprozessen in Verbindung gebracht (Mallat et al., 2000; Haddy et al., 2003; Chin et al., 2003). In dieser Arbeit wurde bei einer endothelialen Einzellschicht eine erhöhte Durchlässigkeit für kardiomyozytäre MP beobachtet, aber nur wenn die Kardiomyozyten mit den Endothelzellen ko-kultiviert und anschließend mit TNF- α stimuliert wurden (Abbildung 40). Wie hier beschrieben und auch schon von anderen beobachtet, hatte eine alleinige Stimulation der Endothelzellen mit TNF- α keinen Einfluss auf die Durchlässigkeit (Friedl et al., 2002). Die vorliegenden Daten lassen vermuten, dass die Kombination von exogenem TNF- α und einem bislang unbekanntem kardiomyozytären Mediator benötigt wird, um die Permeabilität des Endothels zu erhöhen (Abbildung 40). Weiterhin beobachteten Friedl und Mitarbeiter, dass Mitglieder der extrinsischen Koagulationskaskade die Durchlässigkeit von Endothelzellen erhöhen (Friedl et al., 2002). Ebenso wurden PARs als wichtige Faktoren bei der Permeabilitätsmodulation diskutiert (Feistritzer et al., 2005). Kapillaren innerhalb des Herzens bestehen nur aus einer einzelnen Endothelzellschicht und stehen im direkten Kontakt mit Kardiomyozyten. Es wurde beschrieben, dass das Verhalten von kardialen Endothelzellen in Abhängigkeit von der lokalen Umgebung bestimmt wird, wie es hier bei einer Ko-Kultivierung von Endothelzellen mit Kardiomyozyten der Fall war (Aird et al., 1997). Die Autoren vermuteten, dass spezielle Signale der Kardiomyozyten das Verhalten von Endothelzellen (z.B. Beeinflussung der Genexpression) bedingen (Aird et al., 1997). Wie in Abschnitt 5.1 beschrieben, wurde eine erhöhte systemische Thrombogenität des Plasmas, verbunden mit einer gesteigerten TF-Expression im Myokard im ABY-MC-Modell, beobachtet. Eine Zytokin-vermittelte Beschädigung der Endothelschicht ermöglicht die Freisetzung von thrombogenen MP in die Zirkulation. *Vice versa*, Plasmagerinnungsfaktoren würden an die TF-exprimierenden Kardiomyozyten gelangen und so eine Fibrinablagerung innerhalb des Myokards vermitteln. Dadurch kann sich das Risiko für endokardiale Thromboembolien, nach Verletzung des endokardialen Endothels, erhöhen.

6.4 Der Tissue Factor-vermittelte Schutz der Kardiomyozyten vor Apoptose

Neben seiner Rolle als Initiator der Blutgerinnung kommen dem TF/FVIIa-Komplex noch andere Funktionen zu. Es zeigte sich, dass die TF-Expression einen positiven Effekt auf das zelluläre Verhalten z.B. Proliferation der HL-1 Zellen hatte (Abbildung 43). Ferner wurde ein verbessertes zelluläres Überleben der Kardiomyozyten, in Abhängigkeit zur TF-Expression, unter inflammatorischen Bedingungen beobachtet (Abbildung 45 und 48).

Mögliche Anhaltspunkte für eine Erklärung wie der Komplex aus TF und FVIIa in der Regulation von Zellwachstum und -überleben eingreift, weisen unterschiedliche Studien auf. Es ist akzeptiert, dass der aktive TF/FVIIa-Komplex verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden beeinflussen kann (Lopez-Pedreira et al., 2006).

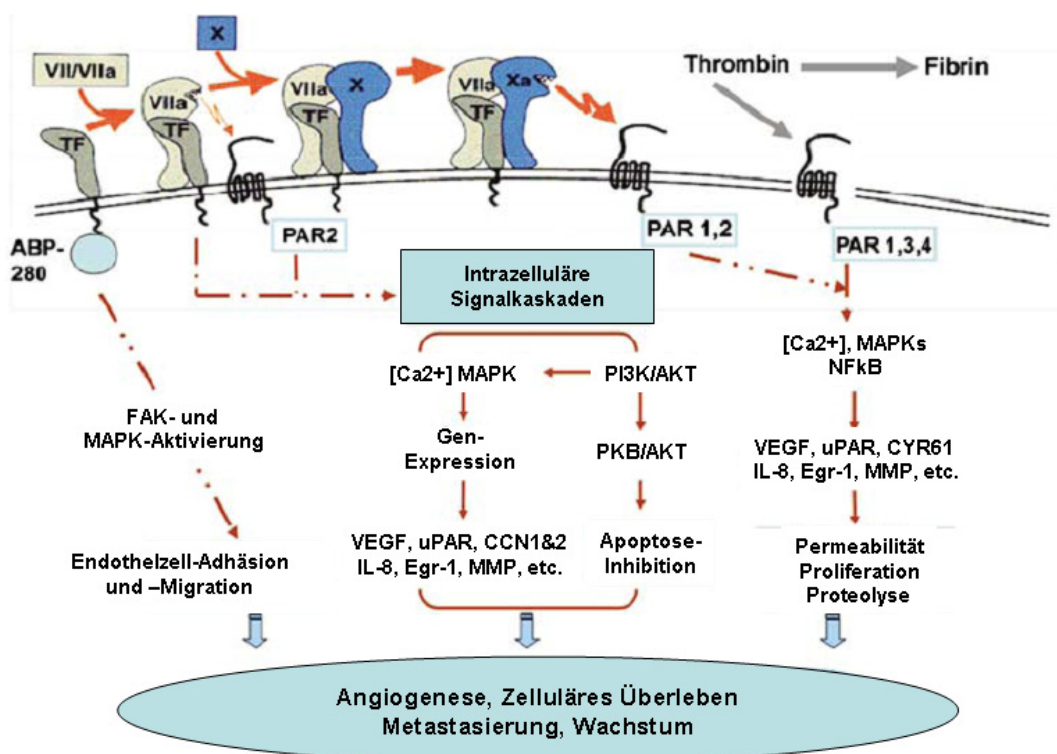


Abbildung 53. Übersicht über das TF/FVIIa-vermittelte intrazelluläre Signaling. (ABP-280: Aktinbindendes Protein 280; CYR61: *cysteine-rich angiogenic inducer 61*; Egr-1: *early growth response factor 1*; FAK: Fokale Adhäsionskinase; MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase; MMP: Matrixmetalloproteasen; NFκB: Nukleärer Faktor κB; PAR: Protease-aktivierter Rezeptor; PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; PKB/AKT: Proteinkinase B (AKT); uPAR: Urokinase Plasminogen Aktivator Rezeptor; VEGF: *vascular endothelial growth factor*) (verändert nach Lopez-Pedreira et al., 2006).

Wie in Abbildung 53 zu sehen, zählen zu den involvierten Signalkaskaden die MAP-Kinasen, die PI3-Kinase, die Beeinflussung des Ca^{2+} -Haushaltes und die Aktivierung von kleinen GTPasen (Monroe und Key, 2007). Hauptsächlich erfolgt die TF-Signaltransduktion über die Komplexbildung mit FVIIa und nachfolgende direkte proteolytische Spaltung von PAR-2 oder indirekt über FXa (Versteeg und Ruf, 2006). Verschiedene Beobachtungen ließen die Schlussfolgerung zu, dass der TF/FVIIa-Komplex wichtig bei der empfindlichen Balance zwischen Proliferation und Apoptose ist. So zeigten sich Defekte bei der Blutgefäßentwicklung in TF *knock out* Mäusen (Carmeliet et al., 1996; Carmeliet et al., 1997), die Unterdrückung der Tumormetastasierung bei Inhibierung der FVIIa-Bindung an TF (Bromberg et al., 1999) und die verminderte Restenose und neointimale Hyperplasie durch selektive Inhibierung von TF/FVIIa (Jang et al., 1995). Die hier beobachtete gesteigerte Wachstumsrate und das Apoptoseverhalten der HL-1 Zellen stimmen mit diesen Beobachtungen überein. Es zeigte sich, dass die Erhöhung der TF-Expressionslevel sowohl die Ki67-Expression (Abbildung 43) signifikant erhöhte als auch den Zellzyklus positiv beeinflusste. Ki67 wird nur in proliferierenden Zellen exprimiert und gilt deshalb als optimaler Proliferationsmarker (Matsuura et al., 2004). Als ein *immediate early gene* hat TF wahrscheinlich Einfluss auf die G1-Phase des Zellzykluses (Hartzell et al., 1989). Ferner wurde beobachtet, dass TF/FVIIa die Proteinsynthese beeinflusst (Versteeg et al., 2002) und verschiedene Wachstumsfaktor-ähnliche Gene induzieren kann (Pendurthi et al., 2000; Camerer et al., 2000a).

Der programmierte Zelltod bzw. die Apoptose kann unter verschiedenen Umständen ausgelöst werden. Dazu gehört die Aktivierung von Transmembranen-Rezeptoren der FAS/TRAIL/TNF Rezeptor-1 Familie (*Death*-Rezeptoren) oder Hypoxie und Wachstumsfaktorentzug (Nagata und Golstein, 1995; Kaufmann und Hengartner, 2001). Beide Signalwege haben eine Aktivierung von Caspasen (Cystein-Aspartyl-Proteasen) zur Folge, die in einer kaskadenartigen Spaltung von Schlüsselsubstraten münden. Die beteiligten Caspasen werden als latente Zymogene synthetisiert und durch proteolytische Spaltung aktiviert (Kaufmann und Hengartner, 2001). Die Apoptose ist gekennzeichnet durch ein Schrumpfen der Zelle (Abbildung 44), eine Zerteilung der DNA durch Endonukleasen in definierte Stücke und die Ausbildung von Membranvesikeln, die durch phagozytierende Zellen aufgenommen werden.

Die TNF- α -vermittelte Aktivierung der *Death*-Rezeptoren beeinflusst nachfolgend die Caspasen 8, 10 und 12. Der durch extrazellulären Stress, wie oxidativer Stress und Wachstumsfaktorentzug, eingeleitete Apoptoseweg wirkt über die Zerstörung der mitochondrialen Membranintegrität, was zur Freisetzung von Cytochrom c und Aktivierung der Caspase 9 führt. Beide Wege überschneiden sich in der parallelen Aktivierung der Effektor-Caspase 3.

In dieser Arbeit wurde ein TF-expressionsabhängiges Apoptoseverhalten beobachtet. Bei einer TF-Überexpression reduzierte sich der Anteil an apoptotische Zellen nach TNF- α -Stimulation (Abbildung 45). Wie in Abbildung 46 gezeigt, hatte im Umkehrschluss eine reduzierte TF-Expression einen Anstieg der toten Zellen zur Folge. Der positive Effekt einer erhöhten TF-Expression war ebenfalls bei Inkubation mit einem weiteren Apoptoseinduktor nachweisbar (Abbildung 47). Camptothecin, ein Inhibitor der Topoisomerase I, ist ebenfalls in der Lage, Apoptose in Kardiomyozyten zu induzieren (Kong und Rabkin, 1999). Durch die selektive Inhibition der Topoisomerase I kommt es zu definierter Fragmentation der genomischen DNA, zum Schrumpfen der Kardiomyozyten und zur Freisetzung von MP (Kong und Rabkin, 1999).

Verschiedene intrazelluläre Signalwege wie MAP-Kinasen und AKT vermitteln das zelluläre Überleben (Datta et al., 1999; Dimmeler und Zeiher, 2000). Das hier beobachtete TF-vermittelte Überleben der Zellen war abhängig von der AKT-Aktivität (Abbildung 48). Diese Beobachtung wird unterstützt von anderen Autoren, so konnte Sorensen et al. zeigen, dass der anti-apoptotische Effekt von FVIIa hauptsächlich durch eine AKT-Aktivierung vermittelt wurde (Sorensen et al., 2003), andere Autoren zeigten aber eine gleichzeitige Beteiligung von ERK1/2 und AKT (Versteeg et al., 2004). Der anti-apoptotische Effekt von AKT war verbunden mit einer reduzierten Caspase 3-Aktivierung (Versteeg et al., 2004). Eine positive Korrelation zwischen TF und der Expression von AKT-1 und -2 wurde in der vorliegenden Arbeit beim MC-Modell beobachtet (Abschnitt 5.1.3).

Erste Hinweise für eine TF/FVIIa-vermittelte veränderte Apoptose stellten sich bei Versuchen an mit TF transfizierten Zellen dar. Diese anti-apoptotische Wirkung war spezifisch für den aktiven TF/FVIIa-Komplex und nicht durch spezifische Inhibitoren für FXa und Thrombin aufhebbar (Sorensen et al., 2003). Wie schon erwähnt, kommt es bei bestehender vaskulären Integrität zu einem Binden von FVIIa an extravaskulären TF (Hoffman et al., 2007). Es lässt sich vermuten, dass es zur

Diskussion

Bildung eines aktiven TF/FVIIa-Komplex auf der HL-1 Zelloberfläche kommt und dass der TF/FVIIa-Komplex zur Aktivierung von PAR-2 führt. Die Aktivierung von Ras und seiner nachfolgenden Effektoren Raf/MEK/ERK sind für das Überleben von Zellen bei bestimmten Umwelteinflüssen notwendig (Erhardt et al., 1999). Es ist bekannt, dass die proteolytische Spaltung von PAR-2 die Aktivierung von p21Ras (Versteeg et al., 2003) und der Raf/MEK/ERK-Signalkaskade induziert (Poulsen et al., 1998; Camerer et al., 1999; Versteeg et al., 2000; Pendurthi et al., 2000; Camerer et al., 2000b). Eine zusätzliche Supplementation mit FX erhöht den anti-apoptotischen Effekt (Versteeg et al., 2004). Somit könnte sowohl die Aktivierung von PAR-2 als auch möglicherweise die von PAR-1 die Effekte vermitteln, da FXa ebenfalls PAR-1 proteolytisch spalten kann. Anders als bei Sorensen et al. (Sorensen et al., 2003) und Versteeg et al. (Versteeg et al., 2004) konnten Jinag et al. nur zeigen, dass die Inkubation von Mamma-Karzinomzellen mit physiologischen Konzentrationen an FVIIa (~10 nM) keinen Einfluss auf die Apoptoserate besaßen. Erst durch gleichzeitige Gabe von einer normalen Plasmakonzentration an FX (150 nM) wurde eine veränderte Apoptoserate beobachtet (Jiang et al., 2006). Diese Ergebnisse implizierten, dass sowohl durch TF/FVIIa als auch durch TF/FVIIa/FXa das zelluläre Überleben durch zellspezifische Signaltransduktionen beeinflusst wird. AKT gilt wie schon erwähnt als der zelluläre anti-apoptotischer Effektor (Datta et al., 1999). Welche nachgeschalteten Signalwege AKT in den Kardiomyozyten beeinflussten, ist jedoch nicht geklärt. Wir zeigten, dass TF/FVIIa die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-xL erhöht und dadurch das zelluläre Überleben nach Zytokin-Stimulation verbessert wird (Boltzen et al., 2008).

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten und die Befunde anderer lassen darauf schließen, dass myokardialer TF einen positiven Einfluss auf das kardiomyozytäre Überleben unter inflammatorischen Bedingungen besitzt.

6.5 Ausblick

Die TF-Expression im Herzen spielt eine bedeutete Rolle bei der lokalen und systemischen Thrombogenität unter inflammatorischen Bedingungen. Da in den *in vivo*-Versuch der gesamte Herzmuskel untersucht wurde, war es nicht möglich zu klären, ob nur der kardiomyozytäre TF oder auch TF-positive myokardiale Fibroblasten einen Einfluss auf die Thrombogenität des Herzens besitzen. Es bedarf weiterführende Tierversuche an speziellen *knock out*-Mäusen, bei denen in den jeweiligen unterschiedlichen Zelltypen wie Kardiomyozyten, Fibroblasten oder Monozyten die TF-Expression fehlt. Weitere Versuche sollten feststellen, ob die TF-vermittelte Signaltransduktion am Kardiomyozyten einen signifikanten Einfluss auf die Progression einer viralen MC hat.

Die *in vitro*-Versuche zur kardiomyozytären TF-Überexpression deuten auf eine TF-vermittelte Reduktion der zellulären Apoptose unter inflammatorischen Bedingungen hin. Ob der TF-vermittelte Schutz vor Zytokin-induzierter Apoptose auch *in vivo* Bedeutung besitzt, kann anhand TF-transgener Mäuse, die eine TF-Überexpression im Kardiomyozyten aufweisen, geklärt werden.

Durch den Einsatz der oben beschriebenen Mäuse mit den unterschiedlichen TF-Expressionen und eine gleichzeitige Kreuzung mit PAR-2-defizienten Mäusen, besteht die Möglichkeit die Bedeutung der myokardialen TF-Expression und die TF-vermittelte Signaltransduktion über PAR-2 bei myokardialen Entzündungsprozessen zu erfassen. Insgesamt weisen die bisherigen Daten dieser Arbeit auf eine essentielle Bedeutung der kardiomyozytären TF-Expression nicht nur für die Thrombogenität des Herzens sondern auch für die Vitalität der Kardiomyozyten, besonders unter inflammatorischen Bedingungen, hin.

7 Zusammenfassung

Entzündliche Prozesse beeinflussen das Gerinnungssystem. Durch die erhöhten Zytokin-Spiegel kommt es zu einer Veränderung der lokalen (gewebsspezifischen) und systemischen Hämostase. Tissue Factor (TF) nimmt in der Hämostase als Initiator der Blutgerinnung eine zentrale Rolle ein. TF kann durch Komplexbildung mit FVIIa neben der Initiation der Blutgerinnung auch zelluläre Signalkaskaden über PAR-2 steuern. Entzündliche Prozesse im Herzen führen zu einem gesteigerten Risiko von thrombotischen Ereignissen und sind mit einer erhöhten Mortalität verbunden. Im Myokard wird TF von Kardiomyozyten und Fibroblasten konstitutiv exprimiert. Experimentelle Studien zeigten bisher nur eine Assoziation zwischen der myokardialen Inflammation und der Entstehung von Thromben im Herzen. Bislang war jedoch nicht geklärt, ob myokardialer TF durch Zytokine induziert wird und damit auch die lokale Thrombusentstehung beeinflusst wird. Weiterhin ist unklar wie die TF-Expression in Kardiomyozyten auf transkriptioneller Ebene gesteuert wird und ob Kardiomyozyten die Thrombogenität der Umgebung durch Freisetzung von TF-positiven Mikropartikel (MP) beeinflussen.

Anhand eines viralen Infektionsmodells wurde eine Myokarditis (MC) bei Mäusen induziert. Es zeigte sich in diesem Tierexperiment, dass die TF-Expression im Myokard im Verlauf der myokardialen Entzündungsreaktion ansteigt. Dies war auch mit einer erhöhten systemischen Thrombogenität verbunden. Aktiver myokardialer TF ko-lokalisierte mit eingewanderten Immunzellen und aktiviertem Endothel. Anhand von humanen Myokardbiopsien von Patienten mit vermuteter Virusbedingter myokardialer Entzündung konnte ebenfalls eine positive Korrelation von TF mit der Aktivierung des Endothels beobachtet werden. Eine vermehrte TF-Expression war in den humanen Proben bei Vorliegen einer chronischen Entzündung jedoch nicht zu beobachten. Die Daten lassen darauf schließen, dass nur die akute und nicht die chronische Entzündung des Herzens mit einer erhöhten TF-Expression assoziiert ist. Mittels *in vitro*-Zellkulturexperimenten wurde bestätigt, dass die Transkription des kardiomyozytären TF-Gen durch TNF- α induzierbar ist. Ferner zeigte sich, dass Kardiomyozyten in der Lage waren TF-positive MP abzugeben, wodurch sich die Thrombogenität der Umgebung erhöhte. Die TF-Geninduktion und die MP-Freisetzung waren mit der Aktivierung des intrazellulären JNK-Signalweges verbunden. In Ko-Kultivierungsversuchen von

Zusammenfassung

Endothelzellen mit Kardiomyozyten wurde beobachtet, dass kardiomyozytäre MP unter inflammatorischen Bedingungen die Fähigkeit besaß, durch eine endotheliale Zellschicht zu diffundieren. Die Diffusionsfähigkeit wurde durch einen bislang unbekanntem Mediator der Kardiomyozyten begünstigt. Des Weiteren wurden im Plasma von Patienten mit akuter myokardialer Schädigung, einem Myokardinfarkt, MP nachgewiesen, auf denen sowohl Kardiomyozyten-spezifische Antigene als auch TF nachweisbar waren. Es lässt sich deshalb folgern, dass Kardiomyozyten nach Stimulation mit Zytokinen thrombogene MP freisetzen und diese nach Diffusion durchs Endothel die Thrombogenität des Plasmas erhöhen.

Ferner wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die TF-Expression der Kardiomyozyten neben seiner Bedeutung bei der Initiation der Blutgerinnung noch eine Bedeutung für das zelluläre Überleben besitzt. Dafür wurden Kardiomyozytenzelllinien generiert, die unterschiedliche TF-Expressionsspiegel aufwiesen. Das Überleben der HL-1 Kardiomyozyten unter inflammatorischen Bedingungen wurde anhand von Stimulationen mit verschiedenen TNF- α -Konzentrationen *in vitro* analysiert. Es zeigte sich, dass eine Überexpression von TF Kardiomyozyten vor TNF- α -induzierter Apoptose schützte. Dieser Schutz war ebenfalls nach Stimulation mit der Apoptose-induzierenden Substanz Camptothecin nachweisbar. Die positive Auswirkung der zellulären TF-Expression wird möglicherweise über den anti-apoptotisch-wirkenden AKT-Pathway vermittelt. Der beobachtete TF-vermittelte Schutz vor Zytokin-induzierten Apoptose könnte durch eine TF/FVIIa-bedingte PAR-2-Aktivierung zu erklären sein.

Zusammenfassen lassen sich die Ergebnisse der Arbeit wie folgt: 1.) Eine myokardiale Entzündung, bedingt durch eine virale Infektion, führt zur einer Erhöhung der TF-Expression im Herzen *in vivo*, welche mit einer gesteigerten lokalen und systemischen Thrombogenität verbunden ist. 2.) Die kardiomyozytäre TF-Expression erhöht sich nach Stimulation mit TNF- α auf TF-mRNA-, -Protein- und -Aktivitätsebene *in vitro*. 3.) Kardiomyozyten können *in vitro* als Quelle für thrombogene MP dienen, die nach Zytokinstimulation abgeschnürt werden und bei Ko-Kultivierungsexperimenten durchs Endothel diffundieren. Ferner ist eine myokardiale Verletzung mit einer erhöhten zirkulierenden MP-Last *in vivo* assoziiert. Die nachgewiesenen MP weisen sowohl kardiomyozytäre Antigene als auch das TF-Protein auf. 4.) Die zelluläre TF-Expression der Kardiomyozyten vermitteln einen

Zusammenfassung

Schutz vor dem Zytokin-induzierten Zelltod *in vitro*. Bei diesem Schutz spielen AKT-vermittelnde Signaltransduktionswege eine Rolle.

Weiterführende Untersuchungen, aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit, sind notwendig, um die involvierten Signalwege der TF-vermittelten Effekte genauer zu untersuchen. Dazu könnte der Einsatz von genetisch veränderten Tieren hilfreich sein. Als mögliche Modelle kämen Mäuse mit einem kardiomyozytären TF *knock out* und Mäuse, die eine PAR-2-Defizienz aufweisen, in Frage. Anhand dieser Modelle könnten *in vivo*-Untersuchungen durchgeführt und die Frage beantwortet werden, welchen Einfluss der kardiomyozytäre TF und die TF/FVIIa-vermittelte Signaltransduktion über PAR-2 auf das Überleben der Zellen *in vivo* hat.

8 Summary

Inflammatory processes have an impact on the coagulation system. Increased levels of inflammatory cytokines alter local (tissue specific) and systemic haemostasis. Tissue Factor (TF) plays a central, initiating role in blood coagulation. In addition to initiating coagulation, through complex formation with FVIIa, TF has an impact in regulating cellular signal cascades via protease activated receptor-2 (PAR-2) activation. Inflammatory processes within the heart lead to an increased risk for thrombotic events and are associated with increased mortality. TF is expressed by cardiomyocytes and fibroblasts within the myocardium. To date, experimental studies have only shown an association between myocardial inflammation and thrombus formation in the heart. It is still unknown, whether myocardial TF is induced by inflammatory cytokines and therefore whether cardiac thrombus development is affected. Moreover, neither the transcriptional regulation of the cardiomyocytic TF-gene nor the possible impact of cardiomyocytes upon extracellular thrombogenicity due to microparticle (MP) release have been investigated in detail.

Myocarditis was induced after the viral infection of competent mice. In this animal model increased TF-expression was observed during myocardial inflammation reaction. This observation was associated with increased systemic blood thrombogenicity. Thrombogenic TF was co-localized with cellular infiltrates and activated endothelium within the inflamed myocardium. Furthermore, a positive correlation of TF-expression and endothelium activation was found in human myocardial biopsies from patients with suspected viral infection of the heart and myocardial inflammation. However, increased TF-expression was not observed in these biopsies. The data suggests that only the acute and not the chronic inflammation process within the heart is associated with increased TF-expression. *In vitro* cell culture experiments have demonstrated that transcription of the TF-gene in cardiomyocytes was inducible by TNF- α . Furthermore, this work demonstrated cardiomyocytes to be a source of thrombogenic MP. The TF-gene induction and MP release was JNK-dependent. Cardiomyocytic MP were able to diffuse through an endothelial monolayer under inflammatory conditions in co-cultivation experiments with endothelial cells and cardiomyocytes, thereby contributing to increased extracellular thrombogenicity. An as yet unknown cardiomyocyte-derived mediator was required to increase endothelial permeability.

Summary

In addition, MP were detected in plasma obtained from patients with acute myocardial damage, such as after myocardial infarction. These circulating MP, when isolated from blood were positive for α -cardiac muscle actin and myosin and, therefore, were of cardiomyocyte origin. This suggests cardiomyocytes to release thrombogenic MP after stimulation with cytokines. These MP diffuse through the endothelium and increase plasma thrombogenicity.

In this work it was further examined whether myocardial TF-expression had, in addition to the initiation of coagulation, an impact on cellular survival. Different HL-1 cardiomyocyte cell lines with altered TF-expression were generated. The survival of HL-1 cardiomyocytes was analyzed by varying TNF- α -concentration *in vitro*. The overexpression of TF in cardiomyocytes protected against TNF- α -induced apoptosis. This protection was also seen after stimulation with camptothecin, a other apoptosis inducer. The observed effects may mediated by anti-apoptotic AKT. The TF-mediated protection against TNF- α -induced apoptosis may be explained by the TF/FVIIa-dependent PAR-2-activation.

The findings of this work can be summarized as follows: 1.) Myocardial inflammation due to viral infection leads to an increased TF-expression within the heart *in vivo*. This is associated with a rise in local and systemic thrombogenicity. 2.) Cardiomyocyte TF-expression is increased after stimulation with TNF- α on mRNA, protein and activity level *in vitro*. 3.) Cardiomyocytes are a source of procoagulant MP under inflammatory conditions *in vitro*. These MP are able to diffuse through an endothelial monolayer *in vitro*. Furthermore, myocardial injury is associated with an increased level of circulating MP *in vivo*. 4.) Cellular TF-expression in cardiomyocytes serves as a protection against cytokine-induced cell death *in vitro*. This protection was AKT-dependent.

Continuative experiments, building upon the results of this work, are necessary to investigate the signal pathways involved in the TF-mediated effects observed. The usage of genetically-modified mice would be helpful. Mice with a cardiomyocyte-specific TF deletion and PAR-2 -negative mice may be a potential animal model. Investigations with these mice strains may answer the open question which impact cardiomyocytic TF and the TF/FVIIa-mediated PAR-2-transduction have for cellular survival *in vivo*.

9 Abkürzungen

ABP-280	Aktinbindendes Protein 280 (Filamin A)
AP-1	Aktivator-Protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
asTF	alternativ gespleißter Tissue Factor (löslicher TF)
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat
AV	Adenovirus
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
ca.	circa
cDNA	zur RNA komplementäre DNA
CFSE	Carboxy-Fluorescein Succinimidyl Ester
CM	Kardiomyopathie
CO	Auswurfvolumen (<i>cardial output</i>)
C _t	Schwellenwert (<i>Theshold Cycle</i>)
CVB3	Coxsackievirus B3
CYR61	<i>cysteine-rich angiogenic inducer 61</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DCM	dilatative Kardiomyopathie
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleotid
ddH ₂ O	<i>aqua bidest.</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleotid 5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
DV	Druck-Volumen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
Egr-1	<i>early growth response factor-1</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMB	Endomyokardbiopsie

Abkürzungen

ESV	Endsystolisches Volumen
EV	Enterovirus
F	Faktor
FAK	fokale Adhäsionskinase
FAM	Fluorescein
FBS	Fötale Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
flTF	<i>full-length</i> Tissue Factor (membranständiger TF)
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	grünfluoreszierendes Protein
HHV	humanes Herpesvirus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HR	Herzschläge
IL	Interleukin
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KU	Kunitz-Domäne
LB	Luria Bertani
LDL	<i>low density</i> Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVEDD	linksventrikuläre enddiastolischer Diameter
LVP	linksventrikulärer Druck
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MC	Myokarditis
NF κ B	Nukleärer Faktor κ B
MMP	Matrixmetalloproteasen
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger-RNA</i>)
NFAT	Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
OD	Optische Dichte (Extinktion)
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	phosphat-gepufferte Salzlösung
PC	L- α -Phosphatidylcholin

Abkürzungen

PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
p.i.	<i>post infection</i>
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol ester
PS	L- α -Phosphatidylserin
PVB19	Parvovirus B19
RNA	Ribonukleinsäure
ROK	RhoA Kinase
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	<i>short-hairpin</i> Ribonukleinsäure
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAMRA	Rhodamin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TetO2	Tetrazyklin-Operator2
TetR	Tetrazyklin-Repressor
TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteases
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
U	<i>unit</i>
uPA	<i>urokinase-like plasminogen activator</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vs.	<i>versus</i>

10 Literatur

Aasrum M und Prydz H. 2002, Gene targeting of tissue factor, factor X, and factor VII in mice: their involvement in embryonic development. *Biochemistry*, 67: 25-32.

Ahamed J, Versteeg HH, Kerver M, Chen VM, Mueller BM, Hogg PJ und Ruf W. 2006, Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 103: 13932-13937.

Aird WC, Edelberg JM, Weiler-Guettler H, Simmons WW, Smith TW und Rosenberg RD. 1997, Vascular bed-specific expression of an endothelial cell gene is programmed by the tissue microenvironment. *J.Cell Biol.*, 138: 1117-1124.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW und Lipman DJ. 1990, Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.*, 215: 403-410.

Aretz HT. 1986, Diagnosis of myocarditis by endomyocardial biopsy. *Med.Clin.North Am.*, 70: 1215-1226.

Armaganian L, Kam G, Eisenberg PR, Schechtman KB und Abendschein DR. 2000, Role of tissue factor-mediated coagulation in ischemia/ reperfusion-induced injury of Langendorf-perfused rabbit hearts. *Coron.Artery Dis.*, 11: 481-487.

Armesilla AL, Lorenzo E, Gomez del AP, Martinez-Martinez S, Alfranca A und Redondo JM. 1999, Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor of activated T cells in human endothelial cells: a role for tissue factor gene expression. *Mol.Cell.Biol.*, 19: 2032-2043.

Bach R, Konigsberg WH und Nemerson Y. 1988, Human tissue factor contains thioester-linked palmitate and stearate on the cytoplasmic half-cystine. *Biochemistry*, 27: 4227-4231.

Bach R, Nemerson Y und Konigsberg W. 1981, Purification and characterization of bovine tissue factor. *J.Biol.Chem.*, 256: 8324-8331.

Bach RR. 1988, Initiation of coagulation by tissue factor. *CRC Crit.Rev.Biochem.*, 23: 339-368.

Bajaj MS, Steer S, Kuppuswamy MN, Kisiel W und Bajaj SP. 1999, Synthesis and expression of tissue factor pathway inhibitor by serum-stimulated fibroblasts, vascular smooth muscle cells and cardiac myocytes. *Thromb.Haemost.*, 82: 1663-1672.

Bajaj SP, Rapaport SI und Brown SF. 1981, Isolation and characterization of human factor VII. Activation of factor VII by factor Xa. *J.Biol.Chem.*, 256: 253-259.

Bauer KA, Kass BL, ten Cate H, Hawiger JJ und Rosenberg RD. 1990, Factor IX is activated in vivo by the tissue factor mechanism. *Blood*, 76: 731-736.

Bazan JF. 1990, Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol.Today*, 11: 350-354.

- Bazzoni F und Beutler B. 1996, The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N.Engl.J.Med.*, 334: 1717-1725.
- Belaouaj AA, Li A, Wun TC, Welgus HG und Shapiro SD. 2000, Matrix metalloproteinases cleave tissue factor pathway inhibitor. Effects on coagulation. *J.Biol.Chem.*, 275: 27123-27128.
- Belting M, Ahamed J und Ruf W. 2005, Signaling of the tissue factor coagulation pathway in angiogenesis and cancer. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 25: 1545-1550.
- Beranek JT. 2002, Tissue factor identifies cardiomyocyte apoptotic bodies in reperfusion injury. *Am.J.Pathol.*, 160: 1543-1544.
- Berckmans RJ, Neiuwland R, Boing AN, Romijn FP, Hack CE und Sturk A. 2001, Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb.Haemost.*, 85: 639-646.
- Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M und Nemerson Y. 2003, Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat.Med.*, 9: 458-462.
- Bogdanov VY, Kirk RI, Miller C, Hathcock JJ, Vele S, Gazdaru M, Nemerson Y und Taubman MB. 2006, Identification and characterization of murine alternatively spliced tissue factor. *J.Thromb.Haemost.*, 4: 158-167.
- Boltzen U, Antoniak S, Schultheiss HP, Rauch U. 2008, Expression of soluble Tissue Factor protects cardiomyocytes against apoptosis induced by camptothecin or TNF-alpha via up-regulation of Bcl-xL. *Clin.Res.Cardiol.*, 97 Suppl 1.
- Bom VJ, van Hinsbergh V, Reinalda-Poot HH, Mohanlal RW und Bertina RM. 1991, Extrinsic activation of human coagulation factors IX and X on the endothelial surface. *Thromb.Haemost.*, 66: 283-291.
- Boys CW, Miller A, Harlos K, Martin DM, Tuddenham EG und O'Brien DP. 1993, Crystallization and preliminary X-ray analysis of human tissue factor extracellular domain. *J.Mol.Biol.*, 234: 1263-1265.
- Bromberg ME, Sundaram R, Homer RJ, Garen A und Konigsberg WH. 1999, Role of tissue factor in metastasis: functions of the cytoplasmic and extracellular domains of the molecule. *Thromb.Haemost.*, 82: 88-92.
- Broze GJ, Jr. 1995, Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb.Haemost.*, 74: 90-93.
- Broze GJ, Jr. und Gailani D. 1993, The role of factor XI in coagulation. *Thromb.Haemost.*, 70: 72-74.
- Broze GJ, Jr. und Majerus PW. 1980, Purification and properties of human coagulation factor VII. *J.Biol.Chem.*, 255: 1242-1247.
- Bugge TH, Xiao Q, Kombrinck KW, Flick MJ, Holmback K, Danton MJ, Colbert MC, Witte DP, Fujikawa K, Davie EW und Degen JL. 1996, Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 93: 6258-6263.

Butenas S, Bouchard BA, Brummel-Ziedins KE, Parhami-Seren B und Mann KG. 2005, Tissue factor activity in whole blood. *Blood*, 105: 2764-2770.

Caforio AL, Mahon NJ, Tona F und McKenna WJ. 2002, Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance. *Eur.J.Heart Fail.*, 4: 411-417.

Camerer E, Gjernes E, Wiiger M, Pringle S und Prydz H. 2000a, Binding of factor VIIa to tissue factor on keratinocytes induces gene expression. *J.Biol.Chem.*, 275: 6580-6585.

Camerer E, Huang W und Coughlin SR. 2000b, Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A.*, 97: 5255-5260.

Camerer E, Rottingen JA, Gjernes E, Larsen K, Skartlien AH, Iversen JG und Prydz H. 1999, Coagulation factors VIIa and Xa induce cell signaling leading to up-regulation of the egr-1 gene. *J.Biol.Chem.*, 274: 32225-32233.

Carmeliet P und Collen D. 1998, Development and disease in proteinase-deficient mice: role of the plasminogen, matrix metalloproteinase and coagulation system. *Thromb.Res.*, 91: 255-285.

Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Van Vlaenderen I, Demunck H, Kasper M, Breier G, Evrard P, Muller M, Risau W, Edgington T und Collen D. 1996, Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature*, 383: 73-75.

Carmeliet P, Moons L, Dewerchin M, Mackman N, Luther T, Breier G, Ploplis V, Muller M, Nagy A, Plow E, Gerard R, Edgington T, Risau W und Collen D. 1997, Insights in vessel development and vascular disorders using targeted inactivation and transfer of vascular endothelial growth factor, the tissue factor receptor, and the plasminogen system. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 811: 191-206.

Carniel E, Sinagra G, Bussani R, Di LA, Pinamonti B, Lardieri G und Silvestri F. 2004, Fatal myocarditis: morphologic and clinical features. *Ital.Heart J.*, 5: 702-706.

Carson SD und Brozna JP. 1993, The role of tissue factor in the production of thrombin. *Blood Coagul.Fibrinolysis*, 4: 281-292.

Carson SD, Henry WM und Shows TB. 1985, Tissue factor gene localized to human chromosome 1 (1pter----1p21). *Science*, 229: 991-993.

Censarek P, Bobbe A, Grandoch M, Schror K und Weber AA. 2007, Alternatively spliced human tissue factor (asHTF) is not pro-coagulant. *Thromb.Haemost.*, 97: 11-14.

Chand HS und Kisiel W. 2007, Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction analysis of a novel tissue factor splice variant in select human solid tumors. *J.Thromb.Haemost.*, 5: 640-641.

Chand HS, Ness SA und Kisiel W. 2006, Identification of a novel human tissue factor splice variant that is upregulated in tumor cells. *Int.J.Cancer*, 118: 1713-1720.

Chin BS, Blann AD, Gibbs CR, Chung NA, Conway DG und Lip GY. 2003, Prognostic value of interleukin-6, plasma viscosity, fibrinogen, von Willebrand factor, tissue factor and vascular endothelial growth factor levels in congestive heart failure. *Eur.J.Clin.Invest.*, 33: 941-948.

Clauss M, Weich H, Breier G, Knies U, Rockl W, Waltenberger J und Risau W. 1996, The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J.Biol.Chem.*, 271: 17629-17634.

Claycomb WC, Lanson NA, Jr., Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A und Izzo NJ, Jr. 1998, HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.*, 95: 2979-2984.

Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A und Olson MF. 2001, Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat.Cell Biol.*, 3: 339-345.

Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, Mutin M, Sanmarco M, Sampol J und gnat-George F. 1999, In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J.Clin.Invest.*, 104: 93-102.

Corpet F. 1988, Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.*, 16: 10881-10890.

Couchman JR und Woods A. 1996, Syndecans, signaling, and cell adhesion. *J.Cell Biochem.*, 61: 578-584.

Courtney JM und Forbes CD. 1994, Thrombosis on foreign surfaces. *Br.Med.Bull.*, 50: 966-981.

Cui MZ, Parry GC, Oeth P, Larson H, Smith M, Huang RP, Adamson ED und Mackman N. 1996, Transcriptional regulation of the tissue factor gene in human epithelial cells is mediated by Sp1 and EGR-1. *J.Biol.Chem.*, 271: 2731-2739.

Daly K, Monaghan M, Richardson P, Jackson G, Jewitt D. 1983, Significant incidence of mural thrombi in acute myocarditis - indication for early anticoagulation. *J.Am.Coll.Cardiol.*, 1: 584.

Datta SR, Brunet A und Greenberg ME. 1999, Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.*, 13: 2905-2927.

Davie EW, Fujikawa K und Kisiel W. 1991, The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry*, 30: 10363-10370.

Davis DR und Erlich JH. 2008, Cardiac tissue factor: roles in physiology and fibrosis. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.*, 35: 342-348.

Davis DR, Wilson K, Sam MJ, Kennedy SE, Mackman N, Charlesworth JA und Erlich JH. 2007, The development of cardiac fibrosis in low tissue factor mice is gender-

dependent and is associated with differential regulation of urokinase plasminogen activator. *J.Mol.Cell.Cardiol.*, 42: 559-571.

Dimmeler S und Zeiher AM. 2000, Akt takes center stage in angiogenesis signaling. *Circ.Res.*, 86: 4-5.

Drake TA, Cheng J, Chang A und Taylor FB, Jr. 1993, Expression of tissue factor, thrombomodulin, and E-selectin in baboons with lethal *Escherichia coli* sepsis. *Am.J.Pathol.*, 142: 1458-1470.

Drake TA, Morrissey JH und Edgington TS. 1989, Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am.J.Pathol.*, 134: 1087-1097.

Dudding L, Haskill S, Clark BD, Auron PE, Sporn S und Huang ES. 1989, Cytomegalovirus infection stimulates expression of monocyte-associated mediator genes. *J.Immunol.*, 143: 3343-3352.

Eaton D, Rodriguez H und Vehar GA. 1986, Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry*, 25: 505-512.

Edgington TS, Dickinson CD und Ruf W. 1997, The structural basis of function of the TF. VIIa complex in the cellular initiation of coagulation. *Thromb.Haemost.*, 78: 401-405.

Eilertsen KE und Osterud B. 2004, Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology. *Blood Coagul.Fibrinolysis*, 15: 521-538.

Engelbrecht AM, Niesler C, Page C und Lochner A. 2004, p38 and JNK have distinct regulatory functions on the development of apoptosis during simulated ischaemia and reperfusion in neonatal cardiomyocytes. *Basic Res.Cardiol.*, 99: 338-350.

Erhardt P, Schremser EJ und Cooper GM. 1999, B-Raf inhibits programmed cell death downstream of cytochrome c release from mitochondria by activating the MEK/Erk pathway. *Mol.Cell.Biol.*, 19: 5308-5315.

Erlich J, Fearn C, Mathison J, Ulevitch RJ und Mackman N. 1999, Lipopolysaccharide induction of tissue factor expression in rabbits. *Infect.Immun.*, 67: 2540-2546.

Erlich JH, Boyle EM, Labriola J, Kovacich JC, Santucci RA, Fearn C, Morgan EN, Yun W, Luther T, Kojikawa O, Martin TR, Pohlman TH, Verrier ED und Mackman N. 2000, Inhibition of the tissue factor-thrombin pathway limits infarct size after myocardial ischemia-reperfusion injury by reducing inflammation. *Am.J.Pathol.*, 157: 1849-1862.

Esmon CT. 1979, The subunit structure of thrombin-activated factor V. Isolation of activated factor V, separation of subunits, and reconstitution of biological activity. *J.Biol.Chem.*, 254: 964-973.

Esmon CT. 2004, The impact of the inflammatory response on coagulation. *Thromb.Res.*, 114: 321-327.

Feistritzer C, Lenta R und Riewald M. 2005, Protease-activated receptors-1 and -2 can mediate endothelial barrier protection: role in factor Xa signaling. *J.Thromb. Haemost.*, 3: 2798-2805.

Felix SB, Staudt A, Dorffel WV, Stangl V, Merkel K, Pohl M, Docke WD, Morgera S, Neumayer HH, Wernecke KD, Wallukat G, Stangl K und Baumann G. 2000, Hemodynamic effects of immunoadsorption and subsequent immunoglobulin substitution in dilated cardiomyopathy: three-month results from a randomized study. *J.Am.Coll.Cardiol.*, 35: 1590-1598.

Fisher KL, Gorman CM, Vehar GA, O'Brien DP und Lawn RM. 1987, Cloning and expression of human tissue factor cDNA. *Thromb.Res.*, 48: 89-99.

Fleck RA, Rao LV, Rapaport SI und Varki N. 1990, Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody. *Thromb.Res.*, 59: 421-437.

Friedl J, Puhlmann M, Bartlett DL, Libutti SK, Turner EN, Gnant MF und Alexander HR. 2002, Induction of permeability across endothelial cell monolayers by tumor necrosis factor (TNF) occurs via a tissue factor-dependent mechanism: relationship between the procoagulant and permeability effects of TNF. *Blood*, 100: 1334-1339.

Gailani D und Broze GJ, Jr. 1993, Factor XII-independent activation of factor XI in plasma: effects of sulfatides on tissue factor-induced coagulation. *Blood*, 82: 813-819.

Gao J, Chang CC, Chen Z, Wang H, Xu X, Hamdy C, McMullen JR, Shioi T, Izumo S und Chua BH. 2007, Resistin, an adipocytokine, offers protection against acute myocardial infarction. *J.Mol.Cell.Cardiol.*, 43: 601-609.

Gertz SD, Fallon JT, Gallo R, Taubman MB, Banai S, Barry WL, Gimple LW, Nemerson Y, Thiruvikraman S, Naidu SS, Chesebro JH, Fuster V, Sarembock IJ und Badimon JJ. 1998, Hirudin reduces tissue factor expression in neointima after balloon injury in rabbit femoral and porcine coronary arteries. *Circulation*, 98: 580-587.

Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roque M, Fallon JT, Badimon JJ, Himber J, Riederer MA und Nemerson Y. 1999, Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 96: 2311-2315.

Goldin-Lang P, Niebergall F, Antoniak S, Szotowski B, Rosenthal P, Pels K, Schultheiss HP und Rauch U. 2007, Ionizing radiation induces upregulation of cellular procoagulability and tissue factor expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Thromb.Res.*, 120: 857-864.

Gomez K und McVey JH. 2006, Tissue factor initiated blood coagulation. *Front.Biosci.*, 11: 1349-1359.

Gosselin J, Flamand L, D'Addario M, Hiscott J und Menezes J. 1992, Infection of peripheral blood mononuclear cells by herpes simplex and Epstein-Barr viruses.

Differential induction of interleukin 6 and tumor necrosis factor-alpha. *J.Clin.Invest.*, 89: 1849-1856.

Gottdiener JS, Gay JA, VanVoorhees L, DiBianco R und Fletcher RD. 1983, Frequency and embolic potential of left ventricular thrombus in dilated cardiomyopathy: assessment by 2-dimensional echocardiography. *Am.J.Cardiol.*, 52: 1281-1285.

Grunig E, Tasman JA, Kucherer H, Franz W, Kubler W und Katus HA. 1998, Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. *J.Am.Coll.Cardiol.*, 31: 186-194.

Guha M und Mackman N. 2001, LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.*, 13: 85-94.

Haddy N, Sass C, Drosch S, Zaiou M, Siest G, Ponthieux A, Lambert D und Visvikis S. 2003, IL-6, TNF-alpha and atherosclerosis risk indicators in a healthy family population: the STANISLAS cohort. *Atherosclerosis*, 170: 277-283.

Hall AJ, Vos HL und Bertina RM. 1999, Lipopolysaccharide induction of tissue factor in THP-1 cells involves Jun protein phosphorylation and nuclear factor kappaB nuclear translocation. *J.Biol.Chem.*, 274: 376-383.

Hartzell S, Ryder K, Lanahan A, Lau LF und Nathan D. 1989, A growth factor-responsive gene of murine BALB/c 3T3 cells encodes a protein homologous to human tissue factor. *Mol.Cell.Biol.*, 9: 2567-2573.

He M, Wen Z, He X, Xiong S, Liu F, Xu J, Li J, Xie Q, Jian Z, Chen F, Xiao B, Pu X und He S. 2002, Observation on tissue factor pathway and some other coagulation parameters during the onset of acute cerebrocardiac thrombotic diseases. *Thromb. Res.*, 107: 223-228.

Heymans S, Pauschinger M, De PA, Kallwellis-Opara A, Rutschow S, Swinnen M, Vanhoutte D, Gao F, Torpai R, Baker AH, Padalko E, Neyts J, Schultheiss HP, Van de Werf F, Carmeliet P und Pinto YM. 2006, Inhibition of urokinase-type plasminogen activator or matrix metalloproteinases prevents cardiac injury and dysfunction during viral myocarditis. *Circulation*, 114: 565-573.

Hoffman M, Colina C, McDonald AG, Arepally GM, Pedersen L, Monroe DM. 2007, Tissue Factor around dermal vessels has bound Factor VII in the absence of injury. *J.Thromb.Haemost.*, 5 Suppl 1.

Howell WH. 1935, Theories of blood coagulation. *Physiologic Review*, 15: 435-470.

Huber SA. 2000, T cells expressing the gamma delta T cell receptor induce apoptosis in cardiac myocytes. *Cardiovasc.Res.*, 45: 579-587.

Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C und Freyssinet JM. 2005, Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology*, 20: 22-27.

Ishikawa Y, Akasaka Y, Ishii T, Yoda-Murakami M, Choi-Miura NH, Tomita M, Ito K, Zhang L, Akishima Y, Ishihara M, Muramatsu M und Taniyama M. 2003, Changes in

the distribution pattern of gelatin-binding protein of 28 kDa (adiponectin) in myocardial remodelling after ischaemic injury. *Histopathology*, 42: 43-52.

Jang Y, Guzman LA, Lincoff AM, Gottsauner-Wolf M, Forudi F, Hart CE, Courtman DW, Ezban M, Ellis SG und Topol EJ. 1995, Influence of blockade at specific levels of the coagulation cascade on restenosis in a rabbit atherosclerotic femoral artery injury model. *Circulation*, 92: 3041-3050.

Jiang X, Guo YL und Bromberg ME. 2006, Formation of tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex prevents apoptosis in human breast cancer cells. *Thromb. Haemost.*, 96: 196-201.

Kalafatis M, Swords NA, Rand MD und Mann KG. 1994, Membrane-dependent reactions in blood coagulation: role of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Biochim.Biophys.Acta*, 1227: 113-129.

Kandolf R und Hofschneider PH. 1985, Molecular cloning of the genome of a cardiotropic Cocksackie B3 virus: full-length reverse-transcribed recombinant cDNA generates infectious virus in mammalian cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 82: 4818-4822.

Kao FT, Hartz J, Horton R, Nemerson Y und Carson SD. 1988, Regional assignment of human tissue factor gene (F3) to chromosome 1p21-p22. *Somat.Cell Mol.Genet.*, 14: 407-410.

Kapadia S, Lee J, Torre-Amione G, Birdsall HH, Ma TS und Mann DL. 1995, Tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J.Clin.Invest.*, 96: 1042-1052.

Kaufmann SH und Hengartner MO. 2001, Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell.Biol.*, 11: 526-534.

Kelley RF, Costas KE, O'Connell MP und Lazarus RA. 1995, Analysis of the factor VIIa binding site on human tissue factor: effects of tissue factor mutations on the kinetics and thermodynamics of binding. *Biochemistry*, 34: 10383-10392.

Kereveur A, Enjyoji K, Masuda K, Yutani C und Kato H. 2001, Production of tissue factor pathway inhibitor in cardiomyocytes and its upregulation by interleukin-1. *Thromb.Haemost.*, 86: 1314-1319.

Key NS, Bach RR, Vercellotti GM und Moldow CF. 1993, Herpes simplex virus type I does not require productive infection to induce tissue factor in human umbilical vein endothelial cells. *Lab.Invest.*, 68: 645-651.

Kim SM, Park JH, Chung SK, Kim JY, Hwang HY, Chung KC, Jo I, Park SI und Nam JH. 2004, Cocksackievirus B3 infection induces cyr61 activation via JNK to mediate cell death. *J.Virol.*, 78: 13479-13488.

Kishimoto C, Kitazawa M und Takada H. 1998, Interstitial fibrin-fibronectin deposition with T cell infiltrates precedes fibrosis in murine viral myocarditis. *Int.J.Exp.Pathol.*, 79: 417-423.

Kishimoto C, Matsumori A, Ohmae M, Tomioka N und Kawai C. 1984, Electrocardiographic findings in experimental myocarditis in DBA/2 mice: complete atrioventricular block in the acute stage, low voltage of the QRS complex in the subacute stage and arrhythmias in the chronic stage. *J.Am.Coll.Cardiol.*, 3: 1461-1468.

Kishimoto C, Ochiai H und Sasayama S. 1992, Intracardiac thrombus in murine Coxsackievirus B3 myocarditis. *Heart Vessels*, 7: 76-81.

Kitaura Y. 1981, Experimental coxsackie B virus myocarditis in mice. *Jpn.Circ.J.*, 45: 747-762.

Klein JB, Wang GW, Zhou Z, Buridi A und Kang YJ. 2002, Inhibition of tumor necrosis factor-alpha-dependent cardiomyocyte apoptosis by metallothionein. *Cardiovasc.Toxicol.*, 2: 209-218.

Klingel K, Hohenadl C, Canu A, Albrecht M, Seemann M, Mall G und Kandolf R. 1992, Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 89: 314-318.

Klingel K, Stephan S, Sauter M, Zell R, McManus BM, Bultmann B und Kandolf R. 1996, Pathogenesis of murine enterovirus myocarditis: virus dissemination and immune cell targets. *J.Virol.*, 70: 8888-8895.

Kohase M, Henriksen-DeStefano D, May LT, Vilcek J und Sehgal PB. 1986, Induction of beta 2-interferon by tumor necrosis factor: a homeostatic mechanism in the control of cell proliferation. *Cell*, 45: 659-666.

Kojima J, Miyazaki S, Fujiwara H, Kumada T und Kawai C. 1988, Recurrent left ventricular mural thrombi in a patient with acute myocarditis. *Heart Vessels*, 4: 120-122.

Kojima T, Katsumi A, Yamazaki T, Muramatsu T, Nagasaka T, Ohsumi K und Saito H. 1996, Human ryudocan from endothelium-like cells binds basic fibroblast growth factor, midkine, and tissue factor pathway inhibitor. *J.Biol.Chem.*, 271: 5914-5920.

Kong JY und Rabkin SW. 1999, Thapsigargin enhances camptothecin-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Pharmacol.Toxicol.*, 85: 212-220.

Kuh JH und Seo Y. 2005, Transatrial resection of a left ventricular thrombus after acute myocarditis. *Heart Vessels*, 20: 230-232.

Kuhl U, Pauschinger M, Bock T, Klingel K, Schwimmbeck CP, Seeberg B, Krautwurm L, Poller W, Schultheiss HP und Kandolf R. 2003, Parvovirus B19 infection mimicking acute myocardial infarction. *Circulation*, 108: 945-950.

Kuhl U, Pauschinger M, Noutsias M, Seeberg B, Bock T, Lassner D, Poller W, Kandolf R und Schultheiss HP. 2005, High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation*, 111: 887-893.

Kuhl U und Schultheiss HP. 1995, Treatment of chronic myocarditis with corticosteroids. *Eur.Heart J.*, 16 Suppl O: 168-172.

Lamoreaux WJ, Fitzgerald ME, Reiner A, Hasty KA und Charles ST. 1998, Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. *Microvasc.Res*, 55: 29-42.

Latham RD, Mulrow JP, Virmani R, Robinowitz M und Moody JM. 1989, Recently diagnosed idiopathic dilated cardiomyopathy: incidence of myocarditis and efficacy of prednisone therapy. *Am.Heart J.*, 117: 876-882.

Lentz SR, Tsiang M und Sadler JE. 1991, Regulation of thrombomodulin by tumor necrosis factor-alpha: comparison of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Blood*, 77: 542-550.

Lenzo JC, Fairweather D, Cull V, Shellam GR und James Lawson CM. 2002, Characterisation of murine cytomegalovirus myocarditis: cellular infiltration of the heart and virus persistence. *J.Mol.Cell.Cardiol.*, 34: 629-640.

Leroyer AS, Isobe H, Leseche G, Castier Y, Wassef M, Mallat Z, Binder BR, Tedgui A und Boulanger CM. 2007, Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J.Am.Coll.Cardiol.*, 49: 772-777.

Levi M und ten Cate H. 1999, Disseminated intravascular coagulation. *N.Engl.J. Med.*, 341: 586-592.

Levi M, van der Poll T und ten Cate H. 2006, Tissue factor in infection and severe inflammation. *Semin.Thromb.Hemost.*, 32: 33-39.

Li YY, Feng YQ, Kadokami T, McTiernan CF, Draviam R, Watkins SC und Feldman AM. 2000, Myocardial extracellular matrix remodeling in transgenic mice overexpressing tumor necrosis factor alpha can be modulated by anti-tumor necrosis factor alpha therapy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 97: 12746-12751.

Liu PP und Mason JW. 2001, Advances in the understanding of myocarditis. *Circulation*, 104: 1076-1082.

Lopez-Pedraza C, Barbarroja N, Dorado G, Siendones E und Velasco F. 2006, Tissue factor as an effector of angiogenesis and tumor progression in hematological malignancies. *Leukemia*, 20: 1331-1340.

Luther T, Dittert DD, Kotsch M, Erlich J, Albrecht S, Mackman N und Muller M. 2000, Functional implications of tissue factor localization to cell-cell contacts in myocardium. *J.Pathol.*, 192: 121-130.

Luther T, Flossel C, Mackman N, Bierhaus A, Kasper M, Albrecht S, Sage EH, Iruela-Arispe L, Grossmann H, Strohle A, Zhang Y, Nawroth PP, Carmeliet P, Loskutoff DJ und Muller M. 1996, Tissue factor expression during human and mouse development. *Am.J.Pathol.*, 149: 101-113.

Luther T und Mackman N. 2001, Tissue factor in the heart. Multiple roles in hemostasis, thrombosis, and inflammation. *Trends Cardiovasc.Med.*, 11: 307-312.

MacFarlene RG. 1972, The theory of blood coagulation., in R Biggs ed., *Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis.*: Oxford, Blackwell Scientific Publications: 1-31.

Mackman N. 2004, Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 24: 1015-1022.

Mackman N. 2005, Tissue-specific hemostasis in mice. *Arterioscler.Thromb. Vasc.Biol.*, 25: 2273-2281.

Mackman N. 1995, Regulation of the tissue factor gene. *FASEB J.*, 9: 883-889.

Mackman N, Brand K und Edgington TS. 1991, Lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the human tissue factor gene in THP-1 monocytic cells requires both activator protein 1 and nuclear factor kappa B binding sites. *J.Exp. Med.*, 174: 1517-1526.

Mackman N, Imes S, Maske WH, Taylor B, Lulis AJ und Drake TA. 1992, Structure of the murine tissue factor gene. Chromosome location and conservation of regulatory elements in the promoter. *Arterioscler.Thromb.*, 12: 474-483.

Mackman N, Morrissey JH, Fowler B und Edgington TS. 1989, Complete sequence of the human tissue factor gene, a highly regulated cellular receptor that initiates the coagulation protease cascade. *Biochemistry*, 28: 1755-1762.

Mackman N, Sawdey MS, Keeton MR und Loskutoff DJ. 1993, Murine tissue factor gene expression in vivo. Tissue and cell specificity and regulation by lipopolysaccharide. *Am.J.Pathol.*, 143: 76-84.

Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM und Tedgui A. 2000, Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation*, 101: 841-843.

Marutsuka K, Hatakeyama K, Yamashita A und Asada Y. 2005, Role of thrombogenic factors in the development of atherosclerosis. *J.Atheroscler.Thromb.*, 12: 1-8.

Mason JW, O'Connell JB, Herskowitz A, Rose NR, McManus BM, Billingham ME und Moon TE. 1995, A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis. The Myocarditis Treatment Trial Investigators. *N.Engl.J.Med.*, 333: 269-275.

Matoba Y, Okubo H und Nose Y. 2004, Therapeutic left ventricular assist device and apheresis on dilated cardiomyopathy. *Artif.Organs*, 28: 171-181.

Matsuura K, Wada H, Nagai T, Iijima Y, Minamino T, Sano M, Akazawa H, Molkenin JD, Kasanuki H und Komuro I. 2004, Cardiomyocytes fuse with surrounding noncardiomyocytes and reenter the cell cycle. *J.Cell Biol.*, 167: 351-363.

- Mazza IL, Jacobs JP, Aldousany A, Chang AC und Burke RP. 1998, Video-assisted cardioscopy for left ventricular thrombectomy in a child. *Ann.Thorac.Surg.*, 66: 248-250.
- Milsom C und Rak J. 2005, Regulation of tissue factor and angiogenesis-related genes by changes in cell shape. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 337: 1267-1275.
- Missoff E und Mair J. 1999, A novel biochemical approach to congestive heart failure: cardiac troponin T. *Am.Heart J.*, 138: 95-99.
- Miyamoto K, Yasuda S, Noguchi T, Tanimoto T, Kakuchi H, Morii I, Kawamura A, Nakatani T, Nonogi H, Goto Y und Miyazaki S. 2005, [Fulminant myocarditis causing severe left heart failure and massive thrombus formation following cardiac tamponade: a case report]. *J.Cardiol.*, 46: 25-31.
- Monaco C, Andreakos E, Young S, Feldmann M und Paleolog E. 2002, T cell-mediated signaling to vascular endothelium: induction of cytokines, chemokines, and tissue factor. *J.Leukoc.Biol.*, 71: 659-668.
- Monroe DM und Key NS. 2007, The tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking. *J.Thromb.Haemost.*, 5: 1097-1105.
- Morawitz P. 1905, Die Chemie der Blutgerinnung. *Ergebn.Physiol.*, 4: 307-422.
- Morel O, Jesel L, Freyssinet JM und Toti F. 2005, Elevated levels of procoagulant microparticles in a patient with myocardial infarction, antiphospholipid antibodies and multifocal cardiac thrombosis. *Thromb.J.*, 3: 15.
- Morrissey JH, Fakhrai H und Edgington TS. 1987, Molecular cloning of the cDNA for tissue factor, the cellular receptor for the initiation of the coagulation protease cascade. *Cell*, 50: 129-135.
- Muller I, Klocke A, Alex M, Kotsch M, Luther T, Morgenstern E, Zieseniss S, Zahler S, Preissner K und Engelmann B. 2003, Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J.*, 17: 476-478.
- Muller WA und Randolph GJ. 1999, Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. *J.Leukoc.Biol.*, 66: 698-704.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G und Erlich H. 1986, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol*, 51 Pt 1: 263-273.
- Nagata S und Golstein P. 1995, The Fas death factor. *Science*, 267: 1449-1456.
- Naito K und Fujikawa K. 1991, Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. Factor XI is activated by thrombin and factor XIa in the presence of negatively charged surfaces. *J.Biol.Chem.*, 266: 7353-7358.
- Nakagawa K, Zhang Y, Tsuji H, Yoshizumi M, Kasahara T, Nishimura H, Nawroth PP und Nakagawa M. 1998, The angiogenic effect of tissue factor on tumors and wounds. *Semin.Thromb.Hemost.*, 24: 207-210.

Nakamura Y, Nakamura K, Fukushima-Kusano K, Ohta K, Matsubara H, Hamuro T, Yutani C und Ohe T. 2003, Tissue factor expression in atrial endothelia associated with nonvalvular atrial fibrillation: possible involvement in intracardiac thrombogenesis. *Thromb.Res.*, 111: 137-142.

Narang R, Cleland JG, Erhardt L, Ball SG, Coats AJ, Cowley AJ, Dargie HJ, Hall AS, Hampton JR und Poole-Wilson PA. 1996, Mode of death in chronic heart failure. A request and proposition for more accurate classification. *Eur.Heart J.*, 17: 1390-1403.

Nemerson Y. 1966, The reaction between bovine brain tissue factor and factors VII and X. *Biochemistry*, 5: 601-608.

Nemerson Y. 1988, Tissue factor and hemostasis. *Blood*, 71: 1-8.

Nemerson Y und Bach R. 1982, Tissue factor revisited. *Prog.Hemost.Thromb.*, 6: 237-261.

Nguyen N, Kuliopulos A, Graham RA und Covic L. 2006, Tumor-derived Cyr61(CCN1) promotes stromal matrix metalloproteinase-1 production and protease-activated receptor 1-dependent migration of breast cancer cells. *Cancer Res*, 66: 2658-2665.

Nolf P. 1938, The coagulation of the blood. *Medicine*, 17: 135-165.

Noutsias M, Rohde M, Block A, Klippert K, Lettau O, Blunert K, Hummel M, Kuhl U, Lehmkuhl H, Hetzer R, Rauch U, Poller W, Pauschinger M, Schultheiss HP, Volk HD und Kotsch K. 2008, Pre-amplification techniques for real-time RT-PCR analyses of endomyocardial biopsies. *BMC.Mol.Biol.*, 9: 3.

Noutsias M, Seeberg B, Schultheiss HP und Kuhl U. 1999, Expression of cell adhesion molecules in dilated cardiomyopathy: evidence for endothelial activation in inflammatory cardiomyopathy. *Circulation*, 99: 2124-2131.

Novotny WF, Girard TJ, Miletich JP und Broze GJ, Jr. 1989, Purification and characterization of the lipoprotein-associated coagulation inhibitor from human plasma. *J.Biol.Chem.*, 264: 18832-18837.

Oeth P, Parry GC und Mackman N. 1997, Regulation of the tissue factor gene in human monocytic cells. Role of AP-1, NF-kappa B/Rel, and Sp1 proteins in uninduced and lipopolysaccharide-induced expression. *Arterioscler.Thromb.Vasc. Biol.*, 17: 365-374.

Ollivier V, Chabbat J, Herbert JM, Hakim J und de PD. 2000, Vascular endothelial growth factor production by fibroblasts in response to factor VIIa binding to tissue factor involves thrombin and factor Xa. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 20: 1374-1381.

Oltrona L, Speidel CM, Recchia D, Wickline SA, Eisenberg PR und Abendschein DR. 1997, Inhibition of tissue factor-mediated coagulation markedly attenuates stenosis after balloon-induced arterial injury in minipigs. *Circulation*, 96: 646-652.

Osterud B. 1998, Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathophysiological roles. *Blood Coagul.Fibrinolysis*, 9 Suppl 1: S9-14.

Osterud B und Rapaport SI. 1977, Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 74: 5260-5264.

Ott I, Fischer EG, Miyagi Y, Mueller BM und Ruf W. 1998, A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280. *J.Cell.Biol.*, 140: 1241-1253.

Paborsky LR, Caras IW, Fisher KL und Gorman CM. 1991, Lipid association, but not the transmembrane domain, is required for tissue factor activity. Substitution of the transmembrane domain with a phosphatidylinositol anchor. *J.Biol.Chem.*, 266: 21911-21916.

Parry GC, Erlich JH, Carmeliet P, Luther T und Mackman N. 1998, Low levels of tissue factor are compatible with development and hemostasis in mice. *J.Clin.Invest*, 101: 560-569.

Parry GC und Mackman N. 1995, Transcriptional regulation of tissue factor expression in human endothelial cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 15: 612-621.

Pauschinger M, Doerner A, Kuehl U, Schwimbeck PL, Poller W, Kandolf R und Schultheiss HP. 1999, Enteroviral RNA replication in the myocardium of patients with left ventricular dysfunction and clinically suspected myocarditis. *Circulation*, 99: 889-895.

Pavic I, Polic B, Crnkovic I, Lucin P, Jonjic S und Koszinowski UH. 1993, Participation of endogenous tumour necrosis factor alpha in host resistance to cytomegalovirus infection. *J.Gen.Virol.*, 74: 2215-2223.

Pawlinski R, Fernandes A, Kehrle B, Pedersen B, Parry G, Erlich J, Pyo R, Gutstein D, Zhang J, Castellino F, Melis E, Carmeliet P, Baretton G, Luther T, Taubman M, Rosen E und Mackman N. 2002, Tissue factor deficiency causes cardiac fibrosis and left ventricular dysfunction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 99: 15333-15338.

Pawlinski R, Tencati M, Holscher T, Pedersen B, Voet T, Tilley RE, Marynen P und Mackman N. 2007, Role of cardiac myocyte tissue factor in heart hemostasis. *J.Thromb.Haemost.*, 5: 1693-1700.

Pendurthi UR, Allen KE, Ezban M und Rao LV. 2000, Factor VIIa and thrombin induce the expression of Cyr61 and connective tissue growth factor, extracellular matrix signaling proteins that could act as possible downstream mediators in factor VIIa x tissue factor-induced signal transduction. *J.Biol.Chem.*, 275: 14632-14641.

Piper HM, Schwartz P, Spahr R, Hutter JF und Spieckermann PG. 1984, Early enzyme release from myocardial cells is not due to irreversible cell damage. *J.Mol.Cell.Cardiol.*, 16: 385-388.

Plendl J, Sinowatz F und Auerbach R. 1995, A transformed murine myocardial vascular endothelial cell clone: characterization of cells in vitro and of tumours derived from clone in situ. *Virchows Arch.*, 426: 619-628.

Literatur

Poulsen LK, Jacobsen N, Sorensen BB, Bergenheim NC, Kelly JD, Foster DC, Thastrup O, Ezban M und Petersen LC. 1998, Signal transduction via the mitogen-activated protein kinase pathway induced by binding of coagulation factor VIIa to tissue factor. *J.Biol.Chem.*, 273: 6228-6232.

Pyo RT, Sato Y, Mackman N und Taubman MB. 2004, Mice deficient in tissue factor demonstrate attenuated intimal hyperplasia in response to vascular injury and decreased smooth muscle cell migration. *Thromb.Haemost.*, 92: 451-458.

Rao LV, Nordfang O, Hoang AD und Pendurthi UR. 1995, Mechanism of antithrombin III inhibition of factor VIIa/tissue factor activity on cell surfaces. Comparison with tissue factor pathway inhibitor/factor Xa-induced inhibition of factor VIIa/tissue factor activity. *Blood*, 85: 121-129.

Rapaport SI. 1991, Regulation of the tissue factor pathway. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 614: 51-62.

Rapaport SI und Rao LV. 1995, The tissue factor pathway: how it has become a "prima ballerina". *Thromb.Haemost.*, 74: 7-17.

Rapaport SI und Rao LV. 1992, Initiation and regulation of tissue factor-dependent blood coagulation. *Arterioscler.Thromb.*, 12: 1111-1121.

Rauch U und Antoniak S. 2007, Tissue factor-positive microparticles in blood associated with coagulopathy in cancer. *Thromb.Haemost.*, 97: 9-10.

Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, Badimon JJ, Hember J, Riederer MA und Nemerson Y. 2000, Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood*, 96: 170-175.

Rehemtulla A, Ruf W und Edgington TS. 1991, The integrity of the cysteine 186-cysteine 209 bond of the second disulfide loop of tissue factor is required for binding of factor VII. *J.Biol.Chem.*, 266: 10294-10299.

Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I und Nordet P. 1996, Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation*, 93: 841-842.

Ruf W und Edgington TS. 1994, Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo. *FASEB J.*, 8: 385-390.

Sambola A, Osende J, Hathcock J, Degen M, Nemerson Y, Fuster V, Crandall J und Badimon JJ. 2003, Role of risk factors in the modulation of tissue factor activity and blood thrombogenicity. *Circulation*, 107: 973-977.

Sandset PM. 1996, Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)--an update. *Haemostasis*, 26 Suppl 4: 154-165.

Sapet C, Simoncini S, Loriod B, Puthier D, Sampol J, Nguyen C, gnat-George F und Anfosso F. 2006, Thrombin-induced endothelial microparticle generation:

identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2. *Blood*, 108: 1868-1876.

Saraste A, Arola A, Vuorinen T, Kyto V, Kallajoki M, Pulkki K, Voipio-Pulkki LM und Hyypia T. 2003, Cardiomyocyte apoptosis in experimental coxsackievirus B3 myocarditis. *Cardiovasc.Pathol.*, 12: 255-262.

Sawa H, Ueda T, Takeyama Y, Yasuda T, Matsumura N, Nakajima T, Ajiki T, Fujino Y, Suzuki Y und Kuroda Y. 2006, Elevation of plasma tissue factor levels in patients with severe acute pancreatitis. *J.Gastroenterol.*, 41: 575-581.

Sawdey M, Podor TJ und Loskutoff DJ. 1989, Regulation of type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in cultured bovine aortic endothelial cells. Induction by transforming growth factor-beta, lipopolysaccharide, and tumor necrosis factor-alpha. *J.Biol.Chem.*, 264: 10396-10401.

Scarpati EM, Wen D, Broze GJ, Jr., Miletich JP, Flandermeyer RR, Siegel NR und Sadler JE. 1987, Human tissue factor: cDNA sequence and chromosome localization of the gene. *Biochemistry*, 26: 5234-5238.

Schnitt SJ, Stillman IE, Owings DV, Kishimoto C, Dvorak HF und Abelmann WH. 1993, Myocardial fibrin deposition in experimental viral myocarditis that progresses to dilated cardiomyopathy. *Circ.Res.*, 72: 914-920.

Schultheiss HP und Kuhl U. 2008, State of diagnostics and therapy of inflammatory cardiomyopathie. *Internist*, 49: 7-16.

Schwartz H, Tolley ND, Foulks JM, Denis MM, Risenmay BW, Buerke M, Tilley RE, Rondina MT, Harris EM, Kraiss LW, Mackman N, Zimmerman GA und Weyrich AS. 2006, Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *J.Exp.Med.*, 203: 2433-2440.

Sebbagh M, Renvoize C, Hamelin J, Riche N, Bertoglio J und Breard J. 2001, Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat.Cell.Biol.*, 3: 346-352.

Sharpe N. 1992, Ventricular remodeling following myocardial infarction. *Am.J. Cardiol.*, 70: 20C-26C.

Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, Koopmeiners L, Key NS und Hebbel RP. 2003, Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood*, 102: 2678-2683.

Shimokawa T, Yamamoto K, Kojima T und Saito H. 2000, Down-regulation of murine tissue factor pathway inhibitor mRNA by endotoxin and tumor necrosis factor-alpha in vitro and in vivo. *Thromb.Res.*, 100: 211-221.

Shoji M, Hancock WW, Abe K, Micko C, Casper KA, Baine RM, Wilcox JN, Danave I, Dillehay DL, Matthews E, Contrino J, Morrissey JH, Gordon S, Edgington TS, Kudryk B, Kreuzer DL und Rickles FR. 1998, Activation of coagulation and angiogenesis in cancer: immunohistochemical localization in situ of clotting proteins and vascular endothelial growth factor in human cancer. *Am.J.Pathol.*, 152: 399-411.

Sigusch HH, Lehmann MH, Schnittler U, Reinhardt D und Figulla HR. 2000, Tumour necrosis factor-alpha expression in idiopathic dilated cardiomyopathy: correlation to myocardial inflammatory activity. *Cytokine*, 12: 1261-1266.

Simak J, Gelderman MP, Yu H, Wright V und Baird AE. 2006, Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome. *J.Thromb.Haemost.*, 4: 1296-1302.

Smith PD, Saini SS, Raffeld M, Manischewitz JF und Wahl SM. 1992, Cytomegalovirus induction of tumor necrosis factor-alpha by human monocytes and mucosal macrophages. *J.Clin.Invest.*, 90: 1642-1648.

Soejima H, Ogawa H, Yasue H, Kaikita K, Nishiyama K, Misumi K, Takazoe K, Miyao Y, Yoshimura M, Kugiyama K, Nakamura S, Tsuji I und Kumeda K. 1999, Heightened tissue factor associated with tissue factor pathway inhibitor and prognosis in patients with unstable angina. *Circulation*, 99: 2908-2913.

Sole MJ und Liu P. 1993, Viral myocarditis: a paradigm for understanding the pathogenesis and treatment of dilated cardiomyopathy. *J.Am.Coll.Cardiol.*, 22: 99A-105A.

Sorensen BB, Rao LV, Tornehave D, Gammeltoft S und Petersen LC. 2003, Antiapoptotic effect of coagulation factor VIIa. *Blood*, 102: 1708-1715.

Spek CA. 2004, Tissue factor: from 'just one of the coagulation factors' to a major player in physiology. *Blood Coagul.Fibrinolysis*, 15 Suppl 1: S3-10.

Spicer EK, Horton R, Bloem L, Bach R, Williams KR, Guha A, Kraus J, Lin TC, Nemerson Y und Konigsberg WH. 1987, Isolation of cDNA clones coding for human tissue factor: primary structure of the protein and cDNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 84: 5148-5152.

Staats HF und Lausch RN. 1993, Cytokine expression in vivo during murine herpetic stromal keratitis. Effect of protective antibody therapy. *J.Immunol.*, 151: 277-283.

Steendijk P, Staal E, Jukema JW und Baan J. 2001, Hypertonic saline method accurately determines parallel conductance for dual-field conductance catheter. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol*, 281: H755-H763.

Steffel J, Hermann M, Greutert H, Gay S, Luscher TF, Ruschitzka F und Tanner FC. 2005, Celecoxib decreases endothelial tissue factor expression through inhibition of c-Jun terminal NH2 kinase phosphorylation. *Circulation*, 111: 1685-1689.

Stempien-Otero A, Plawman A, Meznarich J, Dyamenahalli T, Otsuka G und Dichek DA. 2006, Mechanisms of cardiac fibrosis induced by urokinase plasminogen activator. *J.Biol.Chem.*, 281: 15345-15351.

Sun M, Dawood F, Wen WH, Chen M, Dixon I, Kirshenbaum LA und Liu PP. 2004, Excessive tumor necrosis factor activation after infarction contributes to susceptibility of myocardial rupture and left ventricular dysfunction. *Circulation*, 110: 3221-3228.

Szalay G, Meiners S, Voigt A, Lauber J, Spieth C, Speer N, Sauter M, Kuckelkorn U, Zell A, Klingel K, Stangl K und Kandolf R. 2006, Ongoing coxsackievirus myocarditis

is associated with increased formation and activity of myocardial immunoproteasomes. *Am.J.Pathol.*, 168: 1542-1552.

Szotowski B, Antoniak S, Goldin-Lang P, Tran QV, Pels K, Rosenthal P, Bogdanov VY, Borchert HH, Schultheiss HP und Rauch U. 2007, Antioxidative treatment inhibits the release of thrombogenic tissue factor from irradiation- and cytokine-induced endothelial cells. *Cardiovasc.Res.*, 73: 806-812.

Szotowski B, Antoniak S, Poller W, Schultheiss HP und Rauch U. 2005a, Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines. *Circ.Res.*, 96: 1233-1239.

Szotowski B, Antoniak S und Rauch U. 2006, Alternatively spliced tissue factor: a previously unknown piece in the puzzle of hemostasis. *Trends Cardiovasc.Med.*, 16: 177-182.

Szotowski B, Goldin-Lang P, Antoniak S, Bogdanov VY, Pathirana D, Pauschinger M, Dorner A, Kuehl U, Coupland S, Nemerson Y, Hummel M, Poller W, Hetzer R, Schultheiss HP und Rauch U. 2005b, Alterations in myocardial tissue factor expression and cellular localization in dilated cardiomyopathy. *J.Am.Coll.Cardiol.*, 45: 1081-1089.

Takemura G, Kato S, Aoyama T, Hayakawa Y, Kanoh M, Maruyama R, Arai M, Nishigaki K, Minatoguchi S, Fukuda K, Fujiwara T und Fujiwara H. 2001, Characterization of ultrastructure and its relation with DNA fragmentation in Fas-induced apoptosis of cultured cardiac myocytes. *J.Pathol.*, 193: 546-556.

Tomioka N, Kishimoto C, Matsumori A und Kawai C. 1985, Mural thrombi in mice with acute viral myocarditis. *Jpn.Circ.J.*, 49: 1277-1279.

Tomioka N, Kishimoto C, Matsumori A und Kawai C. 1986, Mural thrombus in experimental viral myocarditis in mice: relation between thrombosis and congestive heart failure. *Cardiovasc.Res.*, 20: 665-671.

Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM und Broze GJ, Jr. 1997, Effect of tissue factor deficiency on mouse and tumor development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 94: 6922-6926.

Torgerson RR und McNiven MA. 1998, The actin-myosin cytoskeleton mediates reversible agonist-induced membrane blebbing. *J.Cell Sci.*, 111: 2911-2922.

Towbin JA. 1998, The role of cytoskeletal proteins in cardiomyopathies. *Curr.Opin.Cell Biol.*, 10: 131-139.

Towbin JA und Bowles NE. 2002, The failing heart. *Nature*, 415: 227-233.

Tran TH, Andreaka P, Rodrigues CO, Webster KA und Bishopric NH. 2007, Jun kinase delays caspase-9 activation by interaction with the apoptosome. *J.Biol.Chem.*, 282: 20340-20350.

Vanhoutte D, Schellings M, Pinto Y und Heymans S. 2006, Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window. *Cardiovasc.Res.*, 69: 604-613.

Versteeg HH, Bresser HL, Spek CA, Richel DJ, van Deventer SJ und Peppelenbosch MP. 2003, Regulation of the p21Ras-MAP kinase pathway by factor VIIa. *J.Thromb.Haemost.*, 1: 1012-1018.

Versteeg HH, Hoedemaeker I, Diks SH, Stam JC, Spaargaren M, van Bergen En Henegouwen PM, van Deventer SJ und Peppelenbosch MP. 2000, Factor VIIa/tissue factor-induced signaling via activation of Src-like kinases, phosphatidylinositol 3-kinase, and Rac. *J.Biol.Chem.*, 275: 28750-28756.

Versteeg HH und Ruf W. 2006, Emerging insights in tissue factor-dependent signaling events. *Semin.Thromb.Hemost.*, 32: 24-32.

Versteeg HH und Ruf W. 2007, Tissue factor coagulant function is enhanced by protein-disulfide isomerase independent of oxidoreductase activity. *J.Biol.Chem.*, 282: 25416-25424.

Versteeg HH, Sorensen BB, Slofstra SH, Van den Brande JH, Stam JC, van Bergen En Henegouwen PM, Richel DJ, Petersen LC und Peppelenbosch MP. 2002, VIIa/tissue factor interaction results in a tissue factor cytoplasmic domain-independent activation of protein synthesis, p70, and p90 S6 kinase phosphorylation. *J.Biol.Chem.*, 277: 27065-27072.

Versteeg HH, Spek CA, Richel DJ und Peppelenbosch MP. 2004, Coagulation factors VIIa and Xa inhibit apoptosis and anoikis. *Oncogene*, 23: 410-417.

Wang H und Keiser JA. 1998, Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1. *Circ.Res.*, 83: 832-840.

Weber KT, Brilla CG, Campbell SE, Zhou G, Matsubara L und Guarda E. 1992, Pathologic hypertrophy with fibrosis: the structural basis for myocardial failure. *Blood Press*, 1: 75-85.

Weikert U, Kuhl U, Schultheiss HP und Rauch U. 2002, Platelet activation is increased in patients with cardiomyopathy: myocardial inflammation and platelet reactivity. *Platelets.*, 13: 487-491.

Werling RW, Zacharski LR, Kisiel W, Bajaj SP, Memoli VA und Rousseau SM. 1993, Distribution of tissue factor pathway inhibitor in normal and malignant human tissues. *Thromb.Haemost.*, 69: 366-369.

Wessely R, Klingel K, Knowlton KU und Kandolf R. 2001, Cardiospecific infection with coxsackievirus B3 requires intact type I interferon signaling: implications for mortality and early viral replication. *Circulation*, 103: 756-761.

Wessely R, Klingel K, Santana LF, Dalton N, Hongo M, Jonathan LW, Kandolf R und Knowlton KU. 1998, Transgenic expression of replication-restricted enteroviral genomes in heart muscle induces defective excitation-contraction coupling and dilated cardiomyopathy. *J.Clin.Invest.*, 102: 1444-1453.

Westermann D, Rutschow S, Van Linthout S, Linderer A, Bucker-Gartner C, Sobirey M, Riad A, Pauschinger M, Schultheiss HP und Tschope C. 2006, Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates left ventricular dysfunction by mediating

pro-inflammatory cardiac cytokine levels in a mouse model of diabetes mellitus. *Diabetologia*, 49: 2507-2513.

Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM und Gordon D. 1989, Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A.*, 86: 2839-2843.

Williams WJ und Norris DG. 1966, Purification of a bovine plasma protein (factor VII) which is required for the activity of lung microsomes in blood coagulation. *J.Biol. Chem.*, 241: 1847-1856.

Wittchen F, Suckau L, Witt H, Skurk C, Lassner D, Fechner H, Sipo I, Ungethum U, Ruiz P, Pauschinger M, Tschöpe C, Rauch U, Kuhl U, Schultheiss HP und Poller W. 2007, Genomic expression profiling of human inflammatory cardiomyopathy (DCMi) suggests novel therapeutic targets. *J.Mol.Med.*, 85: 257-271.

Wojnicz R, Nowalany-Kozielska E, Wojciechowska C, Głanowska G, Wilczewski P, Niklewski T, Zembala M, Polonski L, Rozek MM und Wodniecki J. 2001, Randomized, placebo-controlled study for immunosuppressive treatment of inflammatory dilated cardiomyopathy: two-year follow-up results. *Circulation*, 104: 39-45.

Woodruff JF. 1980, Viral myocarditis. A review. *Am.J.Pathol.*, 101: 425-484.

Wu SQ und Aird WC. 2005, Thrombin, TNF-alpha, and LPS exert overlapping but nonidentical effects on gene expression in endothelial cells and vascular smooth muscle cells. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.*, 289: H873-H885.

Yang TL, Cui J, Taylor JM, Yang A, Gruber SB und Ginsburg D. 2000, Rescue of fatal neonatal hemorrhage in factor V deficient mice by low level transgene expression. *Thromb.Haemost.*, 83: 70-77.

Zhang Y, Deng Y, Luther T, Müller M, Ziegler R, Waldherr R, Stern DM und Nawroth PP. 1994, Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. *J.Clin.Invest.*, 94: 1320-1327.

Zillmann A, Luther T, Müller I, Kotzsch M, Spannagl M, Kauke T, Oelschlagel U, Zahler S und Engelmann B. 2001, Platelet-associated tissue factor contributes to the collagen-triggered activation of blood coagulation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 281: 603-609.

11 Publikationen

Diese Dissertation wurde in Teilen in folgender Publikation veröffentlicht:

Antoniak S, Boltzen U, Riad A, Kallwellis-Opara A, Rohde M, Dörner A, Tschöpe C, Noutsias M, Pauschinger M, Schultheiss HP and Rauch U. 2008, Viral myocarditis and coagulopathy: Increased Tissue Factor expression and plasma thrombogenicity. *J.Mol.Cell.Cardiol.*, 45: 118-126.

Antoniak S, Boltzen U, Eisenreich A, Stellbaum C, Poller W, Schultheiss HP and Rauch U. Regulation of cardiomyocyte TF expression and cardiomyocyte-endothelium interaction under inflammatory conditions. Revision 2008 *J.Thromb.Haemost.*

Weitere Publikationen:

Antoniak S, Boltzen U, Bobbert P, Weithäuser A, Schultheiss HP, Rauch-Kröhnert U. Adiponectin attenuates Tissue Factor-associated thrombogenicity of cardiomyocytes under inflammatory conditions. Revision 2008 *Cardiovasc.Pathol.*

Bobbert P, Rauch U, Stratmann B, Goldin-Lang P, Antoniak S, Bobbert T, Schultheiss HP, Tschöpe D. 2008, High molecular weight adiponectin correlates positively with myeloperoxidase in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res.Clin.Pract.*, im Druck

Goldin-Lang P, Tran QV, Fichtner I, Eisenreich A, Antoniak S, Schultze K, Coupland SE, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U. 2008, Tissue factor expression pattern in human non-small cell lung cancer tissues indicate increased blood thrombogenicity and tumor metastasis. *Oncol.Rep.*, 20: 123-128.

Bobbert P, Antoniak S, Schultheiss HP, Rauch U. 2008, Globular adiponectin but not full length adiponectin induces increased procoagulability in human endothelial cells. *J.Mol.Cell.Cardiol.*, 44: 388-394.

Publikationen

Goldin-Lang P, Pels K, Tran QV, Szotowski B, Wittchen F, Antoniak S, Willich T, Witt H, Hummel M, Lenze D, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U. 2007, Effect of ionizing radiation on cellular procoagulability: transcriptional tissue factor upregulation is associated with inflammation and apoptosis. *Haematologica*, 92: 1091-1098.

Goldin-Lang P, Niebergall F, Antoniak S, Szotowski B, Rosenthal P, Pels K, Schultheiss HP, Rauch U. 2007, Ionizing radiation induces upregulation of cellular procoagulability and tissue factor expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Thromb.Res.*, 120: 857-864.

Szotowski B; Antoniak S, Goldin-Lang P, Tran QV, Pels K, Rosenthal P, Bogdanov VY, Borchert HH, Schultheiss HP, Rauch U. 2007, Antioxidative treatment inhibits the release of thrombogenic tissue factor from irradiation- and cytokine-induced endothelial cells. *Cardiovasc.Res.*, 73:806-812

Rauch U und Antoniak S. 2007, Tissue factor-positive microparticles in blood associated with coagulopathy in cancer. *Thromb.Haemost.*, 97: 9-10.

Szotowski B, Antoniak S, und Rauch U. 2006, Alternatively Spliced Tissue Factor. *Trends.Cardiovasc.Med.*, 16: 177-182

Szotowski B, Antoniak S, Poller W, Schultheiss HP und Rauch U. 2005, Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines. *Circ.Res.*, 96: 1233-1239

Rauch U, Antoniak S, Boots M, Schulze K, Goldin-Lang P, Stein H, Schultheiss HP, Coupland SE. 2005, Association of tissue-factor upregulation in squamous-cell carcinoma of the lung with increased tissue factor in circulating blood. *Lancet Oncol.*, 6: 254

Szotowski B, Goldin-Lang P, Antoniak S, Bogdanov VY, Pathirana D, Pauschinger M, Dörner A, Kuehl U, Coupland SE, Nemerson Y, Hummel M, Poller W, Hetzer R, Schultheiss HP, Rauch U. 2005, Alterations in myocardial tissue factor expression and cellular localization in dilated cardiomyopathy. *J.Am.Coll.Cardiol.*, 45: 1081-1089

Präsentationen auf Fachtagungen und Kongressen:

74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (2008, Mannheim, D)

Antoniak S, Noutsias M, Rohde M, Block A, Boltzen U, Lettau O, Pauschinger M, Kühl U, Lassner D, Poller W, Volk HD, Schultheiss HP, Rauch-Kröhnert U. 2008, Myocardial Tissue Factor Expression is down-regulated in Patients presenting with Inflammatory Cardiomyopathy. Clin.Res.Cardiol., 97 Suppl 1.

Antoniak S, Boltzen U, Riad A, Poller W, Tschöpe C, Schultheiss HP, Rauch-Kröhnert U. 2008, Viral myocarditis and Coagulopathy: Increased Tissue Factor expression and plasma thrombogenicity. Clin.Res.Cardiol., 97 Suppl 1.

Antoniak S, Boltzen U, Eisenreich A, Stellbaum C, Poller W, Schultheiss HP, Rauch-Kröhnert U. 2008, Regulation of cardiomyocyte TF expression and cardiomyocyte-endothelium interaction under inflammatory conditions. Clin.Res.Cardiol., 97 Suppl 1.

Antoniak S, Bobbert P, Boltzen U, Eisenreich A, Poller W, Schultheiss HP, Rauch-Kröhnert U. 2008, Globular Adiponectin reduced the TNF- α -induced thrombogenicity of cardiomyocytes. Clin.Res.Cardiol., 97 Suppl 1.

Bobbert P, Stratmann B, Goldin-Lang P, Antoniak S, Eisenreich A, Schultheiss HP, Tschöpe C, Rauch-Kröhnert U. 2008, High molecular weight adiponectin correlates positively with myeloperoxidase in patients with type 2 diabetes mellitus. Clin.Res.Cardiol., 97 Suppl 1.

Boltzen U, Antoniak S, Schultheiss HP, Rauch-Kröhnert U. 2008, Expression of soluble Tissue Factor protects cardiomyocytes against apoptosis induced by camptothecin or TNF- α via up-regulation of Bcl-x_L. Clin.Res.Cardiol., 97 Suppl 1.

Publikationen

52. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose und Hämostaseforschung e.V. (2008, Wiesbaden, D)

Antoniak S, Noutsias M, Rohde M, Block A, Boltzen U, Lettau O, Kühl U, Poller W, Schultheiss HP, Rauch-Kröhnert U. 2008, Downregulation of the tissue factor expression in patients presenting with inflammatory cardiomyopathy. Hämostaseologie, 28 Suppl 1.

Antoniak S, Boltzen U, Bobbert P, Eisenreich A, Schultheiss HP, Rauch-Kröhnert U. 2008, Regulation of cardiomyocyte TF expression and cardiomyocyte-endothelium interaction under inflammatory conditions. Hämostaseologie, 28 Suppl 1.

Boltzen U, Antoniak S, Rauch-Kröhnert U. 2008, Soluble tissue factor protects cardiomyocytes against TNF- α and camptothecin-induced apoptosis via Bcl-x_L. Hämostaseologie, 28 Suppl 1.

Scientific Sessions of the American Heart Association (2007, Orlando, Florida, USA)

Antoniak S, Boltzen U, Bleis F, Bobbert P, Schultheiss HP and Rauch U. 2007, Cardiomyocytes release Tissue Factor positive microparticle in response to TNF- α : Increase of the extracellular thrombogenicity by microparticle diffusion through endothelium. Circulation, 116: II_10

51. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose und Hämostaseforschung e.V. (2007, Dresden, D)

Antoniak S, Szotowski B, Bobbert P, Boltzen U, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U. 2007, Adiponectin attenuates Tissue Factor associated thrombogenicity of cardiomyocytes under inflammatory conditions. Hämostaseologie, 27 Suppl 1.

Antoniak S, Kallwellis-Opara A, Boltzen U, Riad A, Dörner A, Tschöpe C, Schultheiss HP, Pauschinger M, Rauch U. 2007, Viral Myocarditis is a hypercoagulative state. Increased Tissue Factor expression and plasma Thrombogenicity. Hämostaseologie, 27 Suppl 1.

Publikationen

Bobbert P, Antoniak S, Schultheiss HP, Rauch U. 2007, Adiponectin increases procoagulability of human umbilical vein endothelial cells. Hämostaseologie, 27 Suppl 1.

Goldin-Lang P, Antoniak S, Fichtner I, Schulze K, Coupland SE, Schultheiss HP, Rauch U. 2007, Tissue factor expression pattern in human NSCLC tissues as potential risk factor of thrombogenicity and metastasis formation. Hämostaseologie, 27 Suppl 1.

Goldin-Lang P, Niebergall F, Szotowski B, Antoniak S, Rosenthal P, Pels K, Schultheiss HP, Rauch U. 2007, Ionizing radiation induces upregulation of cellular procoagulability and tissue factor expression in human peripheral blood mononuclear cells. Hämostaseologie, 27 Suppl 1.

Goldin-Lang P, Pels K, Tran QV, Szotowski B, Wittchen F, Antoniak S, Willich T., Witt H, Hummel M, Lenze D, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U. 2007, Effect of ionizing radiation on cellular procoagulability: transcriptional tissue factor upregulation is associated with inflammation and apoptosis. Hämostaseologie, 27 Suppl 1.

21. Meeting of the International Society for Thrombosis and Haemostasis (2007, Geneva, Switzerland)

Antoniak S, Boltzen U, Kallwellis-Opara A, Bobbert P, Riad A, Poller W, Pauschinger M, Schultheiss HP, Rauch U. 2007, Viral Myocarditis is a hypercoagulative state. Increased Tissue Factor expression and plasma thrombogenicity. J.Thromb. Haemost., 5 Suppl 1.

Scientific Sessions of the American Heart Association (2006, Chicago, Illinois, USA)

Rauch U, Eisenreich A, Antoniak S, Goldin-Lang P, Szotowski B, Pauschinger M, Schultheiss HP. 2006, Alternative splicing of Tissue Factor is mediated by Clks in human endothelial cells stimulated with TNF-alpha. Circulation, 114: II_181-II_182.

Publikationen

72. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (2006, Mannheim, D)

Antoniak S, Szotowski B, Pauschinger M, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U. 2006, Tissue Faktor schützt Kardiomyozyten vor TNF- α induzierter Apoptose. Clin.Res.Cardiol., 95 Suppl 5.

Piorkowski M, Fischer S, Antoniak S, Jaster M, Morguet AJ, Rauch U. 2006, Einfluss der LDL-Cholesterol-senkenden Therapie auf die Thrombozytenreaktivität: Vergleich der hochdosierten Atorvastatin-Behandlung mit einer Kombinationstherapie aus Atorvastatin und Ezetimib. Clin.Res.Cardiol., 95 Suppl 5.

27. Congress of the European Society of Cardiology (2005, Stockholm, Sweden)

Rauch U, Szotowski B, Antoniak S, Poller W, Schultheiss HP. 2005, Procoagulant soluble tissue factor is induced in endothelial cells in response to TNF- α . Eur.Heart J., 26 Suppl.

12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Ursula Rauch-Kröhnert, für die Überlassung der interessanten Aufgabenstellung und die gute Betreuung während der Dissertation. Darüber hinaus danke ich ihr für ein freies wissenschaftliches Arbeiten mit immerwährenden konstruktiven Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Mathias F. Melzig möchte ich herzlich für seine Bereitschaft danken, die Betreuung der Arbeit am Fachbereich Pharmazie der Freien Universität Berlin zu übernehmen.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich meinen Dank aussprechen für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die wertvollen Anregungen zur praktischen Arbeit und gegenseitige Unterstützung.

Besonders bedanke ich mich bei Dr. Björn Szotowski, Franziska Bleis, Ulrike Bolzen, Andreas Eisenreich, Alice Weithäuser sowie Dr. Petra Goldin-Lang.

Großer Dank gilt auch meiner Familie, auf deren Unterstützung ich mich während der gesamten Zeit des Studiums und der Promotion immer verlassen konnte.

Fürs unermüdliche Korrekturlesen und für ihre fruchtbaren Anmerkungen möchte ich Antje Zeh, Iris Freitag und Gabriele Bartholdt danken.

Mein weiterer Dank gilt den Mitgliedern und Doktoranden des Sonderforschungsbereiches Transregio 19, die eine bereichernde Zusammenarbeit und interessante Diskussionen ermöglichten, sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung des Forschungsvorhabens.

Ich danke meinen Freunden, besonders Karina, Byrt und James, die mich in den teilweise schwierigen Phasen meiner Promotion begleiteten und mit ihren Zuspruch halfen, die vorliegende Arbeit letztendlich erfolgreich abzuschließen.

13 Lebenslauf

Aufgrund datenrechtlicher Bestimmungen ist der Lebenslauf in der Onlineversion der Dissertation nicht verfügbar.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, daß die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin,