

4. Ergebnisse

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse stammen aus Versuchen an kultivierten humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen. Diese Zellen stellen ein gutes und häufig verwendetes Modell zur *in vitro*-Analyse der Endothelfunktion dar.

4.1 Die Zytokin-induzierte Expression der Tissue Factor-Isoformen und ihre Auswirkung auf die Thrombogenität

4.1.1 Die endotheliale Expression von Tissue Factor-Isoformen

Um in nachfolgenden Experimenten den Einfluss verschiedener proinflammatorischer Zytokine und den der ionisierenden Bestrahlung auf die Expression der TF-Isoformen zu untersuchen, wurden HUVECs mit TNF- α (10 ng/mL) stimuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Stimulation die RNA isoliert.

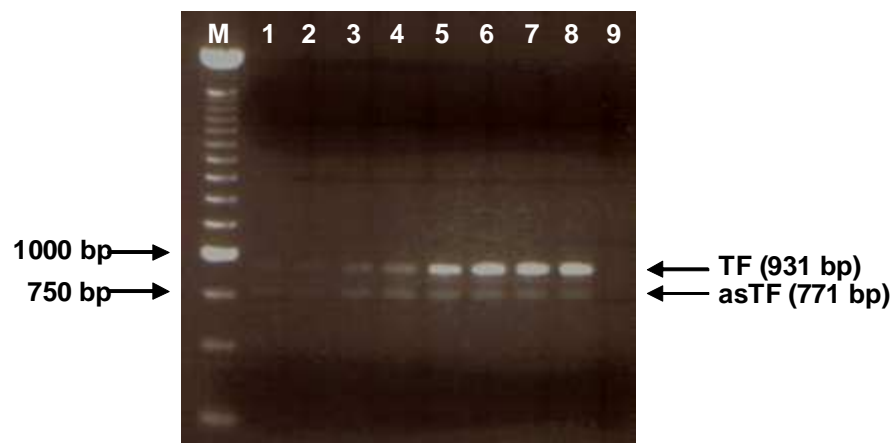


Abbildung 17 Die Expression von TF und asTF nach TNF- α Stimulation (10 ng/mL) in HUVECs. Das PCR-Gel zeigt die mRNA-Expression von TF und seiner Isoform, asTF, zu den angegebenen Zeitpunkten. (M) 250 bp-Marker, (1) unstimulierte Kontrollzellen, Stimulation mit TNF- α für 5 min (2), 10 min (3), 20 min (4), 30 min (5), 40 min (6), 50 min (7) und 60 min (8); (9) Negativkontrolle.

Abbildung 17 zeigt die Expression von TF in HUVECs. Daraus geht hervor, dass HUVECs nicht nur TF, sondern auch die alternativ gespleißte TF-Isoform asTF exprimieren. Die Zellen sind somit geeignet, um die Wirkung unterschiedlicher Stimuli auf die Expression von TF und seiner Isoform hin zu analysieren.

4.1.2 Der Einfluss von TNF- α und IL-6 auf die mRNA-Expression der Tissue Factor-Isoformen

Zur Untersuchung des Effekts der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 auf die mRNA-Expression von TF wurden quantitative Realtime-PCR-Analysen durchgeführt.

Den HUVECs wurde zunächst das im Medium enthaltene Serum entzogen, um den Zellstoffwechsel auf ein basales Niveau zu reduzieren. Vorversuche zeigten, dass hierzu wenigstens zwei Stunden nötig waren. Danach wurden die Zellen entweder mit TNF- α (10 ng/mL) oder IL-6 (10 ng/L) für 10, 40, 60 und 180 min stimuliert. Diese Zeitpunkte stellten sich in Vorversuchen als interessante Messpunkte heraus.

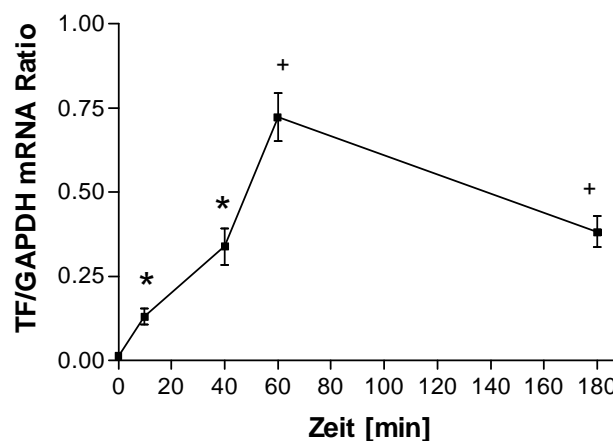


Abbildung 18 Die mRNA-Expression von TF nach TNF- α Stimulation im zeitlichen Verlauf.

⁺ $P < 0,0005$ vs. 0 min, * $P < 0,005$ vs. 0 min

Abbildung 18 zeigt, dass unstimulierte HUVECs fast keine TF-mRNA exprimieren. Jedoch führte eine Stimulation mit TNF- α bereits nach 10 min zu einer signifikanten

Erhöhung der mRNA-Expression von TF, die nach 60 min ihr Maximum erreichte. Auch 180 min nach Stimulation mit TNF- α lag die TF-Expressionsrate noch deutlich über dem Basallevel.

Die Stimulation mit IL-6 (Abbildung 19) erzielte ebenfalls einen signifikanten, jedoch nicht so starken Anstieg an TF-mRNA im Vergleich zur Stimulation mit TNF- α . Die maximale Expression wurde wie nach TNF- α Behandlung auch nach einer Stimulationszeit von 60 min erreicht. 180 min nach Stimulation gab es in der mRNA-Expression von TF keinen signifikanten Unterschied zum Zeitpunkt 0 min.

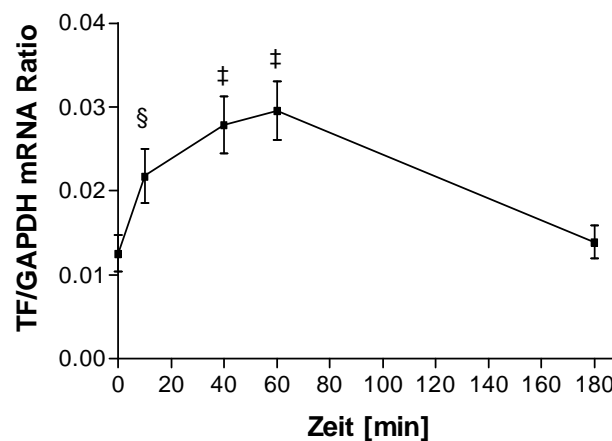


Abbildung 19 Die mRNA-Expression von TF nach IL-6 Stimulation im zeitlichen Verlauf.
‡ $P < 0,003$ vs. 0 min, § $P < 0,03$ vs. 0 min

Die Expressionsanalyse der alternativ gespleißten Isoform in HUVECs nach Zytokin-Stimulation ergab folgende Resultate: Bereits nach 10 minütiger Stimulation mit TNF- α wurden maximale asTF-mRNA-Spiegel erreicht (Abbildung 20), die allerdings um ca. eine Zehnerpotenz niedriger lagen als die der „full-length“ TF zum selben Zeitpunkt. Die mRNA-Expression von asTF war 40 min nach Stimulation mit TNF- α nur noch halb so stark erhöht wie zum Zeitpunkt des maximalen Anstiegs. Im weiteren betrachteten Zeitraum blieb die mRNA-Expression von asTF verglichen mit dem Wert zum Zeitpunkt 0 min nur gering erhöht.

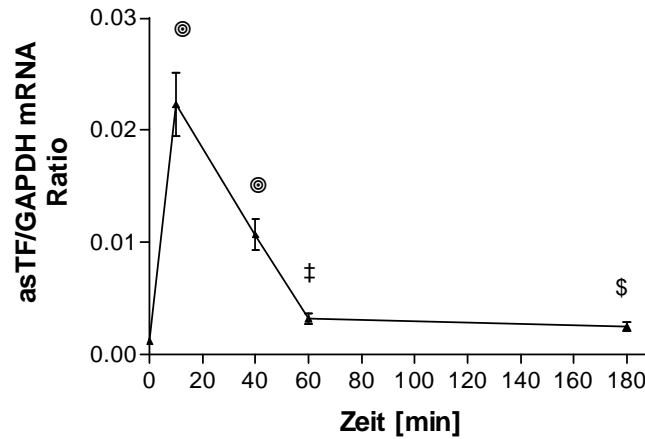


Abbildung 20 Die mRNA-Expression von asTF nach TNF- α Stimulation im zeitlichen Verlauf.
 $\text{⊙} P < 0,001$ vs. 0 min, $\text{‡} P < 0,01$ vs. 0 min, $\text{§} P < 0,05$ vs. 0 min

Wie bei der „full-length“ TF-Expression resultierte die Stimulation mit IL-6 in einem nur schwach ausgeprägten Anstieg an asTF-mRNA. In Abbildung 21 ist zu sehen, dass zum Zeitpunkt 40 min die mRNA maximal erhöht war.

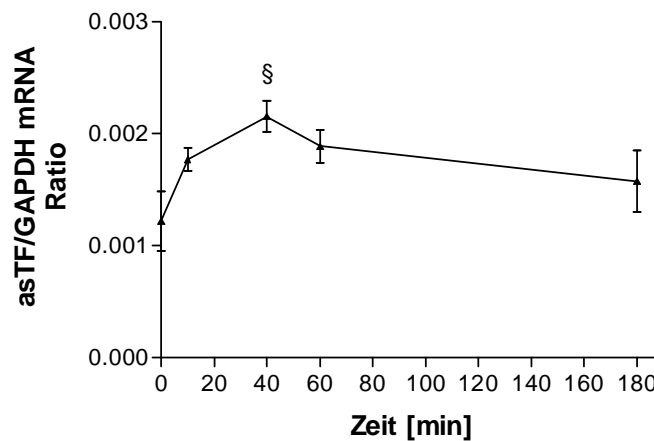


Abbildung 21 Die mRNA-Expression von asTF nach IL-6 Stimulation im zeitlichen Verlauf.
 $\text{§} P < 0,03$ vs. 0 min

Die Tatsache, dass die mRNA-Expression von „full-length“ TF und asTF nach Stimulation ihre Maxima zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreichten, deutet darauf hin, dass der Prozess des alternativen Spleißens differentiell reguliert wird.

4.1.3 Die Detektion der Tissue Factor Proteine in Zytokin-stimulierten HUVECs

Zum Nachweis, dass die endotheliale TF- und asTF-Expression durch Zytokin-Stimulation nicht nur transkriptionell, sondern auch auf Proteinebene beeinflusst wird, wurden zum einen immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen, zum anderen Western Blots durchgeführt.

Sowohl die Behandlung mit TNF- α , als auch mit IL-6 führten zu einer Verstärkung der TF- bzw. asTF-spezifischen Immunfluoreszenz-Signale. Dies wird in Abbildung 22 exemplarisch für den Zeitpunkt fünf Stunden nach Zytokin-Stimulation dargestellt. Abbildung 22 A + B stellen die Negativkontrollen dar, bei denen anstelle der spezifischen Primärantikörper unspezifische Maus- bzw. Kanninchen-Immunglobuline verwendet wurden. Verglichen mit den unstimulierten Kontrollzellen (Abbildung 22 C), die nur schwach positive Signale für beide TF-Isoformen zeigen, weisen die Zellen nach fünfstündiger Behandlung sowohl mit TNF- α (Abbildung 22 D-F) als auch mit IL-6 (Abbildung 22 G-H) eine deutliche Färbung auf, wobei die Signale der IL-6-stimulierten Zellen schwächer erschienen als die nach TNF- α -Stimulation.

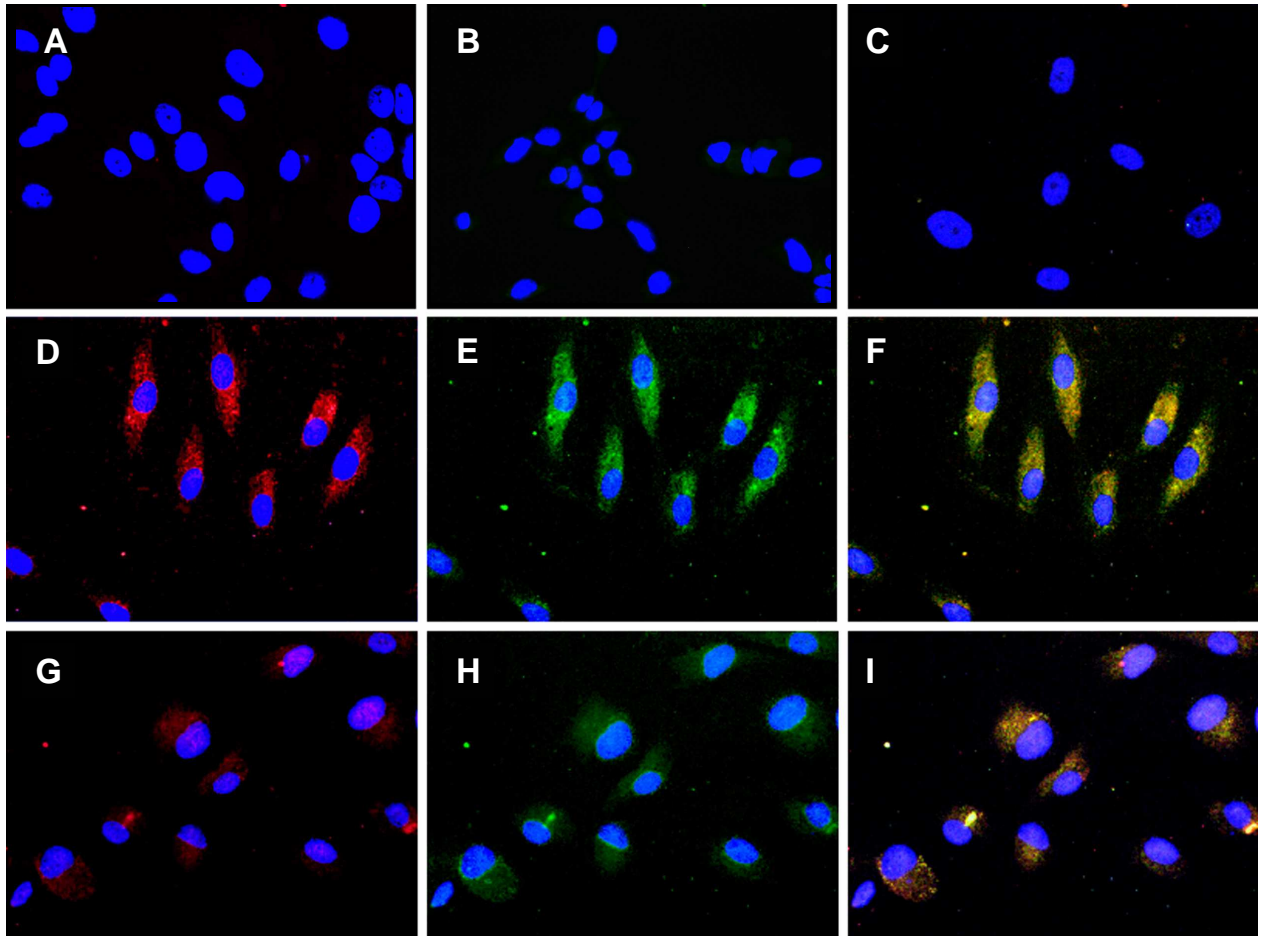


Abbildung 22 Die Zytokin-induzierte Expression der TF-Isoformen in HUVECs nach fünf-stündiger Stimulation. (A+B) Negativkontrollen; immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HUVECs mit TF- (grün) und asTF-spezifischen (rot) Antikörpern vor (C) und nach fünf-stündiger Stimulation mit TNF- α (D-F) bzw. IL-6 (G-I). Zellkerne erscheinen blau. Die Kolokalisation von TF und asTF ist in den Bildern C, F und I dargestellt. Vergrößerung: 200x

Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Untersuchung von Zell-Lysaten unstimulierter, TNF- α - und IL-6-stimulierter HUVECs mittels Western Blot. Auch hier wiesen die Zytokin-behandelten Zellen gegenüber den unstimulierten Kontrollen wesentlich höhere Protein-Konzentrationen an TF und asTF auf, was sich im Western Blot in der Intensität der Proteinbanden ausdrückt. Erneut wurden beim direkten Vergleich beider Stimuli intensivere Banden nach der Behandlung mit TNF- α gefunden.

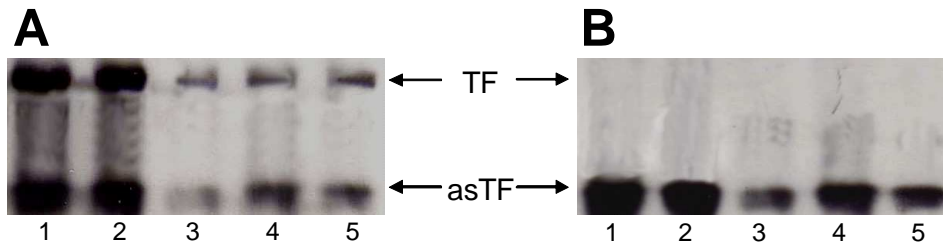


Abbildung 23 Die Protein-Expression der TF-Isoformen in HUVECs nach Zytokin-Stimulation. In der Abbildung sind Western Blots von Zell-Lysaten aus TNF- α - (Bahnen 1+2) bzw. IL-6-stimulierten (Bahnen 4+5) HUVECs vor (Bahn 3) und nach Stimulation für 5 h (Bahnen 1+4) bzw. 18 h (Bahnen 2+5) zu sehen. Die Proteine in Abbildung A wurden mit einem gegen die extrazelluläre Domäne gerichteten Antikörper detektiert, in Abbildung B mit asTF-spezifischen Antikörpern.

4.1.4 Der Nachweis von löslichem asTF im Zellkultur-Überstand

Um zu überprüfen, ob alternativ gespleißter TF nicht nur zellulär, sondern auch extrazellulär nachweisbar ist, wurde der Zellkultur-Überstand von HUVECs vor und nach Stimulation mit Zytokinen auf die TF-Isoformen hin untersucht.

Im Überstand unstimulierter Endothelzellen wurden weder „full-length“ TF noch löslicher asTF gefunden (Abbildung 24 A, Bahn 1). Nach Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α und IL-6 konnten vornehmlich starke Banden für asTF detektiert werden, wohingegen die für „full-length“ TF nur schwach wahrnehmbar waren.

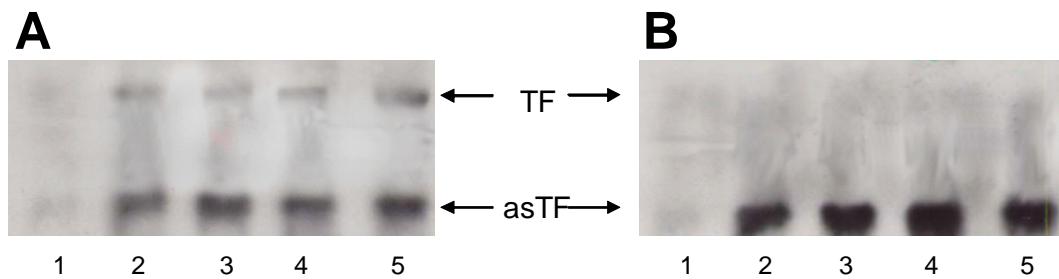


Abbildung 24 TF und asTF im Zellkultur-Überstand von HUVECs nach Zytokin-Stimulation. Die Abbildung zeigt Western Blots von Zellkultur-Überständen TNF- α - (Bahnen 2+3) bzw. IL-6-stimulierter (Bahnen 4+5) HUVECs vor (Bahn 1) und nach Stimulation für 5 h (Bahnen 2+4) bzw. 18 h (Bahnen 3+5). Die Proteine in Abbildung A wurden mit einem gegen die extrazelluläre Domäne gerichteten Antikörper detektiert, in Abbildung B mit asTF-spezifischen Antikörpern.

4.1.5 Die Redistribution von zellulärem TFPI in den Zellkultur-Überstand nach Zytokin-Stimulation

Da die Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen nicht nur allein die Expression von TF und seiner Isoform, sondern auch von anderen, für die Blutgerinnung wichtigen Proteinen beeinflusst, wurde im weiteren Verlauf untersucht, welchen Effekt die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 auf die Expression von TFPI, dem natürlichen Gegenspieler von TF, haben. Hierzu wurden zum einen die zelluläre Expression von TFPI und TF nach Zytokin-Behandlung mittels Immunfluoreszenzmikroskopie, zum anderen Veränderungen der zellulären und extrazellulären TFPI-Konzentrationen per Western Blot untersucht.

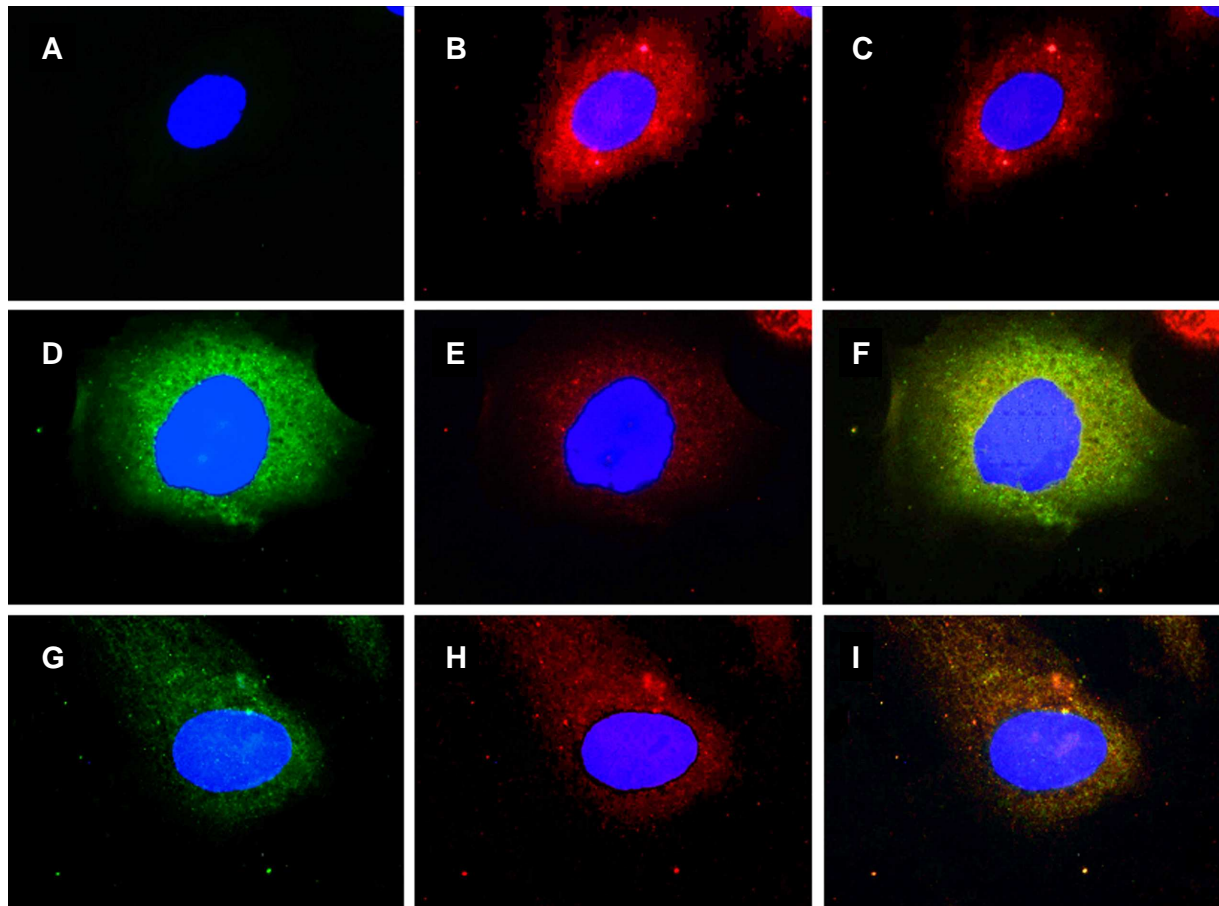


Abbildung 25 Die Zytokin-induzierte TF-Expression und TFPI -Sekretion in HUVECs nach fünf-stündiger Stimulation. In dieser immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahme wurden folgende Antigene mittels spezifischer Antikörper detektiert: zellulärer TF (grün) und TFPI (rot). Des Weiteren sind die Zellkerne abgebildet (blau). Die Aufnahmen entstanden vor (A-C) und nach fünf-stündiger Stimulation mit TNF- α (D-F) bzw. IL-6 (G-H) der HUVECs. Die Kolokalisation von TF und TFPI ist in den Aufnahmen C, F und I dargestellt. Vergrößerung: 1000x

Während die TF-Konzentration nach Zytokin-Stimulation zellulär anstieg (Abbildung 25), führten TNF- α sowie IL-6 zu einer zellulären Abnahme an endotheliale TFPI (Abbildung 25 E + H) verglichen mit der unstimulierten Kontrolle (Abbildung 25 B).

Im Zuge der Verminderung an zellulärem TFPI nach Zytokin-Stimulation ließ sich im korrespondierenden Zellkultur-Überstand mittels Western Blot vermehrt TFPI nachweisen (Abbildung 26).

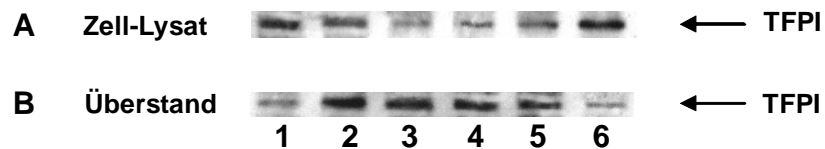


Abbildung 26 Die Redistribution von zellulärem TFPI in den Zellkultur-Überstand nach Zytokin-Stimulation. Die Abbildung zeigt Western Blots von Zell-Lysaten endothelialer Zellen (A) und dem korrespondierenden Zellkultur-Überstand (B) vor und nach Zytokin-Stimulation. Zur Detektion wurde ein TFPI-spezifischer Antikörper eingesetzt. Bahn 1: unstimulierte Kontrolle; Bahn 2: TNF- α -Stimulation für 5 h; Bahn 3: TNF- α -Stimulation für 18 h; Bahn 4: IL-6-Stimulation für 18 h; Bahn 5: IL-6-Stimulation für 5 h; Bahn 6: unstimulierte Kontrolle.

Die hämostatische Balance der Endothelzellen gerät somit nach Zytokin-Stimulation zum einen durch die erhöhte zelluläre TF-Expression, zum anderen durch die Sekretion seines Gegenspielers TFPI in den Überstand in ein Ungleichgewicht zugunsten prothrombogener Faktoren.

4.1.6 Die Wirkung von TNF- α und IL-6 auf die zelluläre Prokoagulabilität endothelialer Zellen

Zur Überprüfung, ob die Erhöhung der zellulären TF-Konzentration nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen auch mit einer erhöhten zellulären Prokoagulabilität assoziiert ist, wurde vor und nach Stimulation ein chromogener Aktivitäts-Assay zur Bestimmung der TF-vermittelten Generierung von F Xa durchgeführt.

Abbildung 27 zeigt, dass die Stimulation mit TNF- α bereits nach 3 h zu einem knapp 17-fachen Anstieg an zellulärer, prokoagulatorischer Aktivität gegenüber unstimulierten HUVECs führte ($258,8 \pm 43,7$ U vs. $4295,3 \pm 376,5$ U, $P < 0,0002$). Auch fünf bzw. acht Stunden nach Stimulation erzielten die Aktivitätsmessungen vergleichbar hohe Werte wie nach drei Stunden. Selbst nach einer TNF- α -

Behandlung für 18 h war im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle die prokoagulatorische Aktivität noch signifikant erhöht.

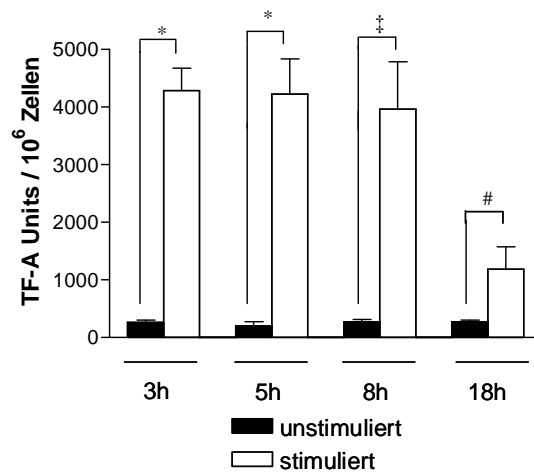


Abbildung 27 Die zelluläre TF-Aktivität nach Stimulation mit TNF- α zu unterschiedlichen Zeitpunkten. * $P < 0,0002$, † $P < 0,003$, # $P < 0,001$

Die prokoagulatorische Aktivität IL-6-stimulierter Zellen fiel im Einklang mit den Ergebnissen der mRNA-Quantifizierung deutlich geringer aus. So betragen die maximal gemessenen Werte nach IL-6-Stimulation nur etwa ein Viertel von denen, die nach TNF- α -Stimulation erlangt wurden. Dennoch blieb die prokoagulatorische Aktivität über den gesamten betrachteten Zeitraum hinweg signifikant gegenüber den unstimulierten Kontrollen erhöht (Abbildung 28).

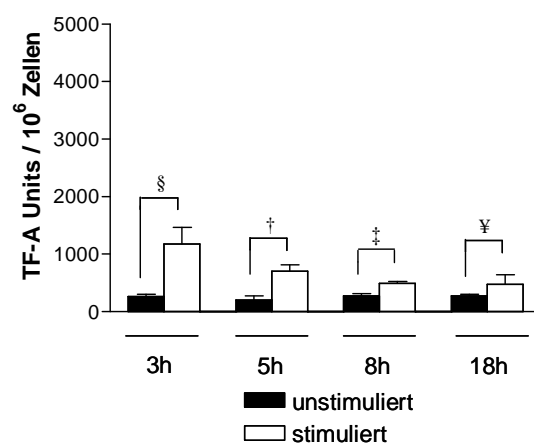


Abbildung 28 Die zelluläre TF-Aktivität nach Stimulation mit IL-6 zu unterschiedlichen Zeitpunkten. † $P < 0,0003$, ‡ $P < 0,003$, § $P < 0,01$, ¥ $P < 0,03$

4.1.7 Die prokoagulatorische Aktivität im Zellkultur-Überstand

4.1.7.1 Der Nachweis des erfolgreichen Entfernens von Mikropartikeln aus dem Zellkultur-Überstand

Da es sich bei Mikropartikeln um Fragmente aktivierter oder apoptotischer Zellen handelt, lassen sich endotheliale Mikropartikel durch spezifische Oberflächenmarker aktivierter Endothelzellen, beispielsweise E-Selektin (CD62E), durchflusszytometrisch nachweisen.

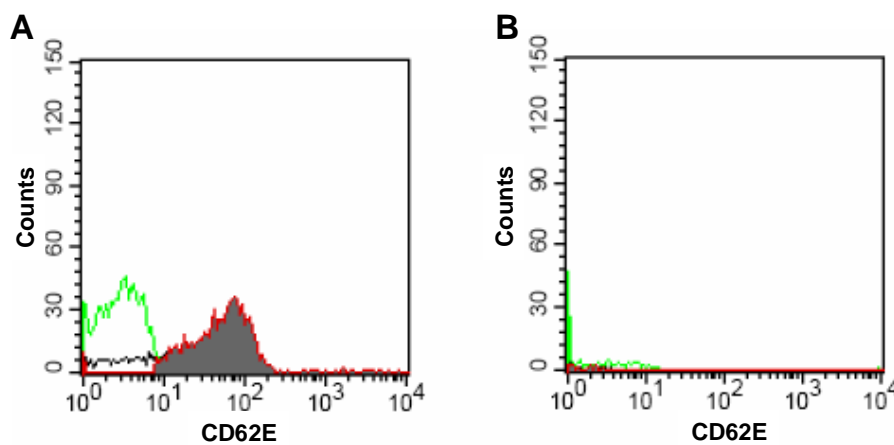


Abbildung 29 Die durchflusszytometrisch Detektion endothelialer Mikropartikel im Zellkultur-Überstand TNF- α -stimulierter HUVECs. Histogramm A zeigt die im Pellet verbleibenden endothelialen Mikropartikel nach erfolgter Zentrifugation. Histogramm B zeigt die durchflusszytometrische Analyse des Zellkultur-Überstandes nach erfolgter Zentrifugation und verifiziert, dass der verbleibende Überstand frei von Mikropartikeln ist. (grün: unspezifische Markierung mit Maus-Immunglobulinen, rot: CD62E-spezifische Markierung)

In Abbildung 29 wird deutlich, dass nach dem Abtrennen der Mikropartikel keine signifikanten Reste endothelialer Mikropartikel in der flüssigen Phase verbleiben. Verbleibende Mikropartikel würden die Messung der prokoagulatorischen Aktivität der löslichen TF-Isoform asTF verfälschen.

4.1.7.2 Die Bedeutung von Phospholipiden für die prokoagulatorische Aktivität von asTF

Die Interaktion mit den Phospholipiden aus der Zellmembran ist für die prokoagulatorische Aktivität von TF von enormer Wichtigkeit, um einen aktiven Komplex mit F VII/VIIa auszubilden. Da die Gegenwart von Phospholipiden für die prokoagulatorische Aktivität der TF-Isoform essentiell ist, wurden in den folgenden Versuchen für die Aktivitätsmessungen des Mikropartikel-freien Zellkultur-Überstandes exogene Phospholipidvesikel hinzugefügt.

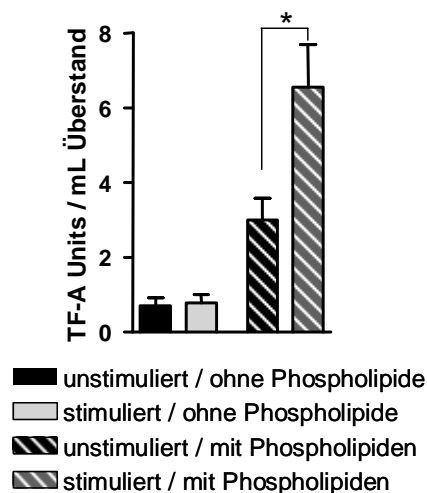


Abbildung 30 Die prokoagulatorische Aktivität im Zellkultur-Überstand in Abhängigkeit von Phospholipidvesikeln. Die Stimulation der Zellen erfolgte für 5 h mit TNF- α .
* $P < 0,00001$

Wie in Abbildung 30 zu sehen ist, ist eine prokoagulatorische Aktivität erst nach Zugabe von L-Phosphatidylcholin- und L-Phosphatidylserin-haltigen Vesikeln (10 μ M) messbar.

4.1.7.3 Der Einfluss von extrazellulärem TFPI auf die Aktivitäts-Messung im Zellkultur-Überstand

Da der natürliche Gegenspieler von TF, TFPI, wie in Kapitel 4.1.5 beschrieben aus TNF- α - und IL-6-stimulierten HUVECs sezerniert wird, wurde der zu messende Überstand mit gegen TFPI-gerichteten, inhibitorischen Antikörpern versetzt, um zu testen, ob TFPI auch in der Lage ist, mit asTF zu interagieren.

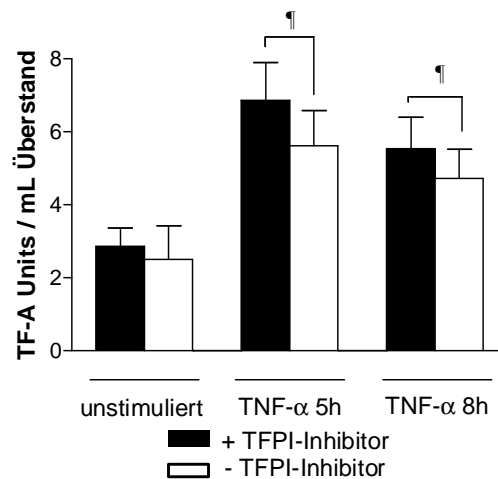


Abbildung 31 Der Einfluss von inhibitorischen TFPI-Antikörpern auf die prokoagulatorische Aktivität im Zellkultur-Überstand TNF- α -stimulierter HUVECs. $^{\dagger}P < 0,05$

Es zeigte sich, dass in den Experimenten, bei denen inhibitorische TFPI-Antikörper eingesetzt wurden, die gemessene prokoagulatorische Aktivität durchschnittlich um 16 % höher ausfiel als bei denen ohne Inhibitor. Da sich die Aktivitätsmessung im Überstand unstimulierter HUVECs mit und ohne Inhibitor nicht signifikant unterschied, kann ausgeschlossen werden, dass die Erhöhung der Aktivität als ein unspezifischer Effekt nach Inhibitor-Zugabe anzusehen ist, bedingt durch die bloße Anwesenheit des Antikörpers. Auf Grund dieses Ergebnisses wurden alle Experimente in Gegenwart des TFPI-Inhibitors durchgeführt.

4.1.7.4 Die prokoagulatorische Aktivität im Zellkultur-Überstand nach Zytokin-Stimulation

Um zu unterscheiden, ob die prokoagulatorische Aktivität im Überstand nach Zytokin-Stimulation auf die lösliche TF-Isoform asTF oder „full-length“ TF zurückzuführen ist, wurde asTF durch Immunpräzipitation mit asTF-spezifischen Antikörpern aus dem Überstand entfernt. Anstelle des polyklonalen asTF-spezifischen Antikörpers wurde zur Immunpräzipitation auch unspezifisches IgG vom Kaninchen verwendet. Dadurch sollte gezeigt werden, dass der asTF-spezifische Antikörper keine unspezifischen Bindungen eingeht. Die Immunpräzipitation mit unspezifischen Antikörpern führte im Gegensatz zu der mit spezifischen nicht zur Entfernung von löslichem asTF aus dem Zellkultur-Überstand (Abbildung 32).

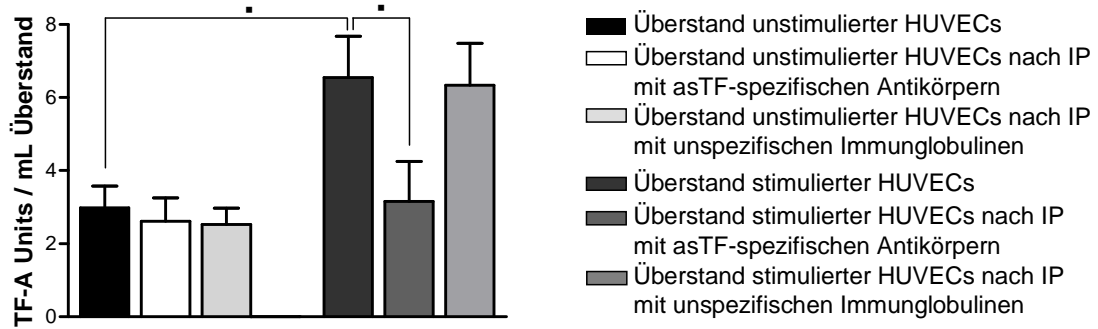


Abbildung 32 Die prokoagulatorische Aktivität im Überstand nach fünf-stündiger Stimulation mit TNF- α vor und nach Immunpräzipitation (IP) mit asTF-spezifischen bzw. unspezifischen Antikörpern. $P < 0,00001$

In der Gegenwart von Phospholipidvesikeln und TFPI-Inhibitor ließ sich eine erhöhte TF-Aktivität nach fünf-stündiger Stimulation der Zellen mit TNF- α im Mikropartikel-freien Überstand nachweisen: Die Aktivität stieg von $2,99 \pm 0,59$ U im Überstand unstimulierter Zellen auf $6,55 \pm 1,13$ U nach Stimulation an ($P < 0,00001$, Abbildung 33). Selbst 18 Stunden nach Stimulation mit TNF- α war im Überstand stimulierter Zellen die Aktivität noch signifikant gegenüber dem korrespondierenden Kontrollüberstand erhöht.

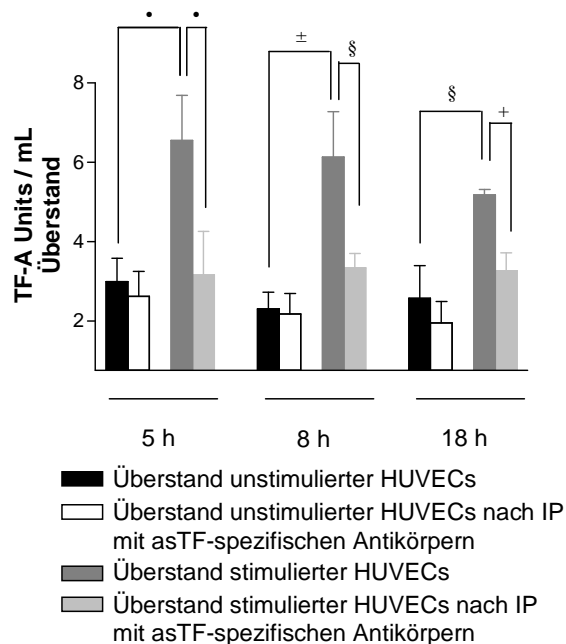


Abbildung 33 Die prokoagulatorische Aktivität im Mikropartikel-freien Überstand von TNF- α -behandelten HUVECs. $^*P < 0,00001$, $^+P < 0,0004$, $^{\pm}P < 0,002$, $^{\S}P < 0,01$

Durch Immunpräzipitation mit asTF-spezifischen Antikörpern konnte zu jedem betrachteten Zeitpunkt die Aktivität auf ein Level gesenkt werden, das dem der unstimulierten korrespondierenden Kontrolle vergleichbar war (Abbildung 33).

Somit trägt die nach TNF- α -Stimulation in den Überstand sezernierte lösliche TF-Isoform zur erhöhten Prokoagulabilität des Überstandes bei.

Trotz einer signifikanten Erhöhung der zellulären TF-Aktivität nach Stimulation mit IL-6 (Abbildung 28) wurde im Mikropartikel-freien Überstand zu keinem Zeitpunkt eine erhöhte prokoagulatorische Aktivität gegenüber den unstimulierten Kontrollen gemessen (Abbildung 34).

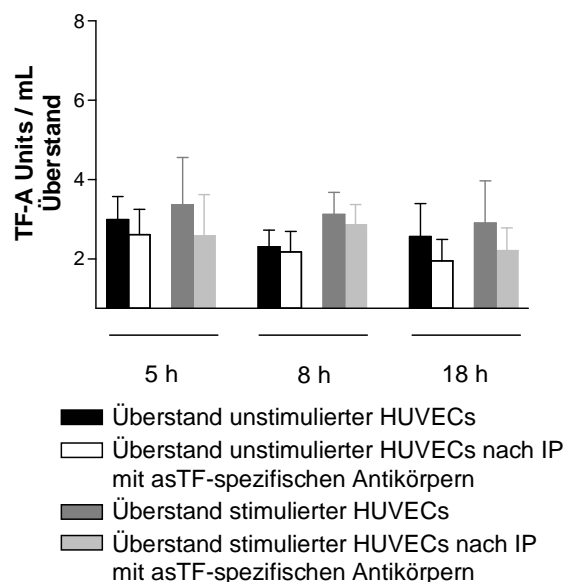


Abbildung 34 Die prokoagulatorische Aktivität im Mikropartikel-freien Überstand von IL-6-behandelten HUVECs.

4.1.7.5 Die Mikropartikel-assoziierte prokoagulatorische Aktivität im Zellkultur-Überstand nach Stimulation mit TNF- α

Nicht nur die lösliche TF-Isoform asTF trägt zur extrazellulären, prokoagulatorischen Aktivität bei, sondern auch TF-exponierende Mikropartikel. Um zu beurteilen, welche Bedeutung diese Mikropartikel für die extrazelluläre Prokoagulabilität nach TNF- α -Stimulation im Vergleich zu löslichem asTF einnehmen, wurden die zuvor isolierten Mikropartikel der Aktivitätsmessung unterzogen.

Abbildung 35 veranschaulicht, dass die Mikropartikel-assoziierte prokoagulatorische Aktivität im untersuchten Zeitraum stetig anstieg. Bereits fünf Stunden nach Stimulation mit TNF- α war die von den Mikropartikeln ausgehende Aktivität signifikant gegenüber der Aktivität der unstimulierten Kontrolle erhöht ($7,18 \pm 0,30$ U vs. $2,30 \pm 0,40$ U, $P < 0,0004$). Nach 18-stündiger Stimulation mit TNF- α lag die Mikropartikel-assoziierte Aktivität am höchsten ($16,86 \pm 1,93$ U), wohingegen die prokoagulatorische Aktivität des löslichen asTF nach Erreichen seines Aktivitätsmaximum nach fünf Stunden stetig abnahm.

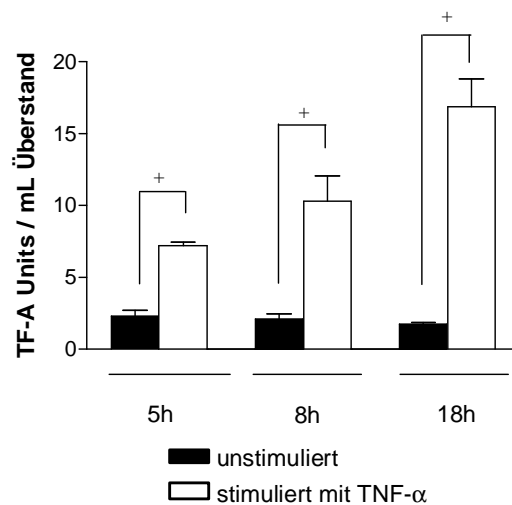


Abbildung 35 Die Mikropartikel-assoziierte prokoagulatorische Aktivität nach TNF- α -Stimulation im zeitlichen Verlauf. $^+P < 0,0004$

Setzt man die prokoagulatorische Aktivität der Mikropartikel mit der Aktivität von asTF ins Verhältnis, so nimmt sie im zeitlichen Verlauf deutlich zu. Auf Grund der geringen Aktivität der löslichen TF-Isoform lässt sich folgern, dass asTF nur eine untergeordnete Rolle bei prokoagulatorischen Prozessen spielt. Vielmehr könnte asTF als früher Marker einer dysregulierten Hämostase des Endothels an Bedeutung erlangen.

4.2 Auswirkungen von Inhibitoren der intrazellulären Signaltransduktion auf das Zytokin-induzierte Spleißverhalten des Tissue Factor-Gens

Im Folgenden soll untersucht werden, ob durch Inhibition einzelner intrazellulärer Signaltransduktionswege das Spleißverhalten des TF-Gens beeinflusst werden kann.

4.2.1 Der Einfluss von Inhibitoren des NF- κ B-Signaltransduktionsweges auf die mRNA-Expression der TF-Isoformen

Eine Stimulation mit TNF- α führt in Endothelzellen zu einer Aktivierung des NF- κ B-Signaltransduktionsweges, der letztendlich in einer Translokation von NF- κ B in den Zellkern resultiert. Dort nimmt er neben einer Vielzahl von anderen Genen auch Einfluss auf die Genexpression von TF. Nachfolgend sollte untersucht werden, welche Auswirkung der NF- κ B-Inhibitor BAY 11-7082 auf die TF-Expression nach TNF- α -Stimulation hat. Hierzu wurden die Endothelzellen 1 h vor der eigentlichen Stimulation mit TNF- α (10 ng/mL) mit dem NF- κ B-Inhibitor BAY 11-7082 (10 μ g/mL) inkubiert. Bei dem Inhibitor handelt es sich um einen selektiven und irreversiblen Inhibitor der TNF- α -induzierten Phosphorylierung von I κ B α (Pierce et al., 1997).

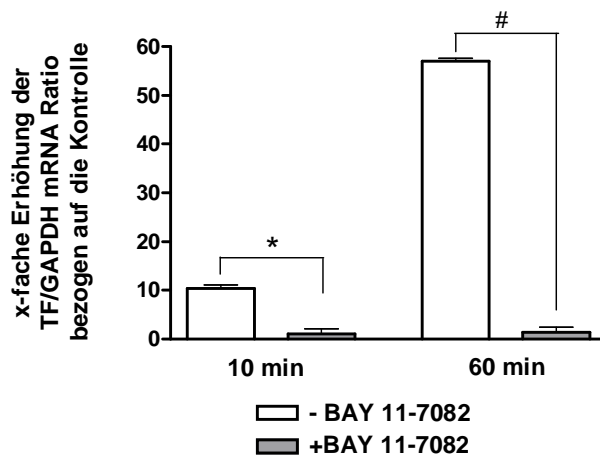


Abbildung 36 Der Effekt des NF- κ B-Inhibitors BAY 11-7082 auf die relative Veränderung der TF-Genexpression nach Stimulation mit TNF- α zu den angegebenen Zeitpunkten. # $P < 0,005$, * $P < 0,01$

Der Einsatz des NF- κ B-Inhibitors BAY 11-7082 führte zu einer kompletten Inhibition der TF-Genexpression nach Stimulation mit TNF- α . Verglichen mit den Expressionsdaten der unstimulierten Kontrollen wurden nach erfolgter TNF- α -Stimulation bei Einsatz des NF- κ B-Inhibitors weder für „full-length“ TF (Abbildung 36) noch für die Isoform (Abbildung 37) signifikante Veränderungen festgestellt.

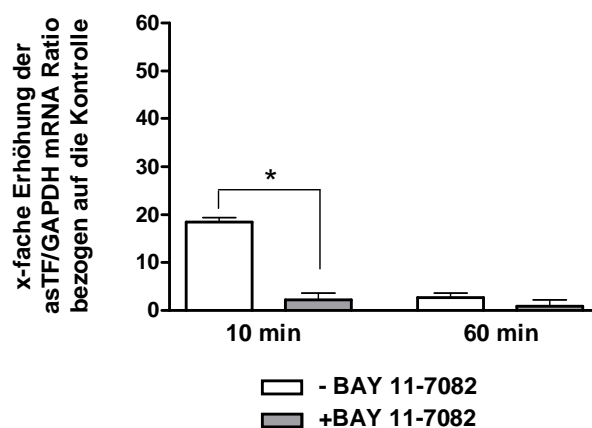


Abbildung 37 Der Effekt des NF- κ B-Inhibitors BAY 11-7082 auf die relative Veränderung der Genexpression von asTF nach Stimulation mit TNF- α zu den angegebenen Zeitpunkten. * $P < 0,01$

4.2.2 Die Auswirkung des CLK-Inhibitors TG003 auf die Expression der Tissue Factor-Isoformen

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, können CDC-ähnliche Kinasen mit SR-Proteinen interagieren und sie phosphorylieren, was letztendlich zu Veränderungen bei Spleißprozessen führen kann.

Daher sollte untersucht werden, ob der Einsatz des CLK-Inhibitors TG003, ein Benzothiazol-Derivat, Einfluss auf den Spleißvorgang des TF-Gens hat. Zu diesem Zweck wurden HUVECs eine Stunde lang mit dem CLK-Inhibitor TG003 (10 µg/mL) präinkubiert, anschließend erfolgte eine Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF-α (10 ng/mL).

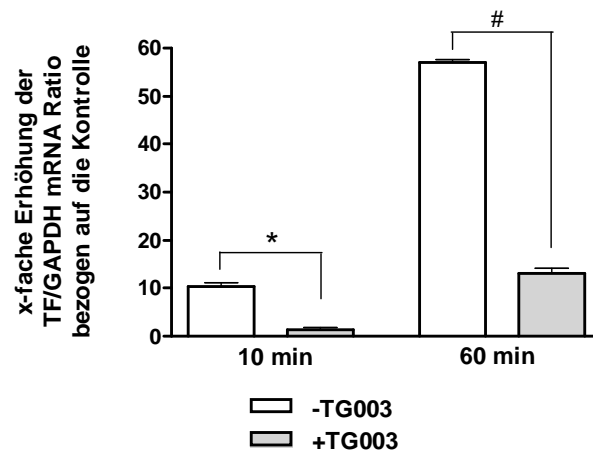


Abbildung 38 Der Effekt des CLK-Inhibitors TG003 auf die relative Veränderung der TF-Genexpression nach Stimulation mit TNF-α zu den angegebenen Zeitpunkten. # $P < 0,005$, * $P < 0,01$

Während gegenüber der unstimulierten Kontrolle die „full-length“ TF-Expression nach alleiniger TNF-α-Stimulation um ca. das 10-fache erhöht war, so konnte nach Präinkubation der Zellen mit dem CLK-Inhibitor keine Erhöhung der TF-Expression festgestellt werden (Abbildung 38). 60 min nach Stimulation bewirkte die Inhibition der CDC-ähnlichen Kinasen eine signifikante Reduktion der TNF-α-induzierten TF-Expression von knapp 80 %.

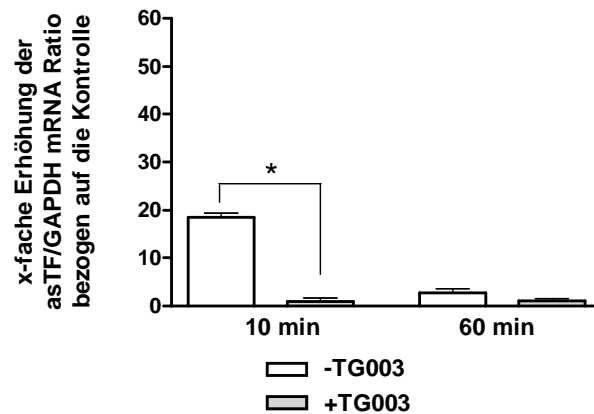


Abbildung 39 Der Effekt des CLK-Inhibitors TG003 auf die relative Veränderung der Genexpression von asTF nach Stimulation mit TNF- α zu den angegebenen Zeitpunkten. * $P < 0,01$

Im Gegensatz zur „full-length“ Variante konnte durch die vorherige Behandlung mit dem CLK-Inhibitor die Expression der alternativ gespleißten TF-Isoform komplett unterbunden werden (Abbildung 39). Weder 10 min noch 60 min nach Stimulation mit TNF- α gab es signifikante Veränderungen gegenüber den unstimulierten Kontrollen.

4.3 Die endotheliale Expression der Tissue Factor-Isoformen nach ionisierender Bestrahlung

4.3.1 Der Einfluss ionisierender Bestrahlung auf die endotheliale mRNA-Expression der Tissue Factor-Isoformen

Bislang ist bekannt, dass ionisierende Bestrahlung in Endothelzellen zu einer *de novo*-Proteinsynthese von TF führt (Verheij et al., 1995). Wie sich die ionisierende Bestrahlung jedoch konkret auf die mRNA-Expression von TF im Langzeitversuch auswirkt, blieb bis dato ungeklärt. Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, wurden HUVECs mit unterschiedlichen Dosen (5 Gy und 10 Gy) bestrahlt und die mRNA-Expression von TF über einen Zeitraum von 15 Tagen gemessen. Repräsentative Zeitpunkte waren die Tage drei, sieben und fünfzehn nach Bestrahlung.

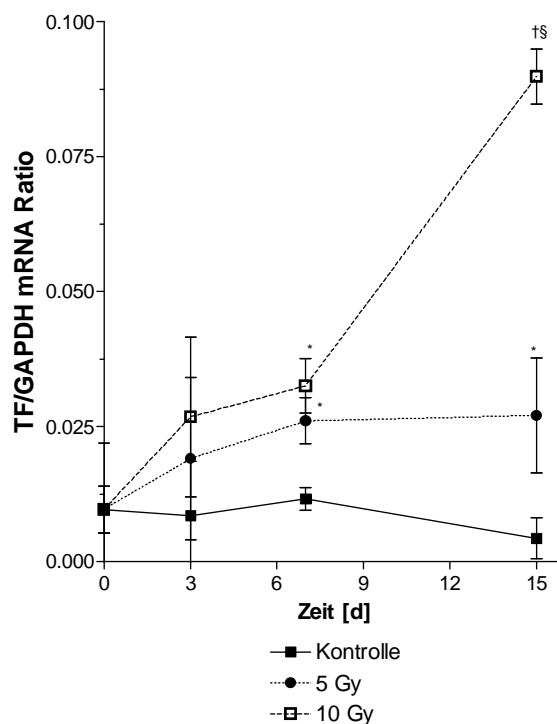


Abbildung 40 Die strahlungsinduzierte mRNA-Expression von TF in HUVECs in Abhängigkeit von der Strahlendosis. (I:SEM) † $P < 0,0001$ vs. Kontrolle, § $P < 0,002$ vs. 5 Gy, * $P < 0,05$ vs. Kontrolle

Die Bestrahlung der HUVECs führte zu einer dosisabhängigen Expression von TF. Während am siebten Tag nach Bestrahlung die TF-mRNA-Expression in beiden Strahlungsgruppen signifikant gegenüber den unbestrahlten Kontrollen erhöht war, kam es in den Zellen, die mit 10 Gy bestrahlt wurden, zu einem weiteren Anstieg, der am 15. Tag nach Bestrahlung maximal erhöht war. Hingegen zeigten die Zellen in der anderen Gruppe an Tag 15 verglichen mit Tag 7 keinen signifikanten Unterschied auf.

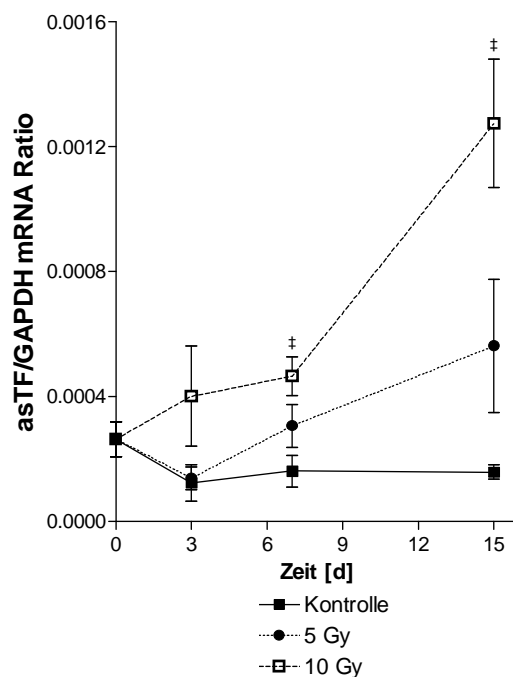


Abbildung 41 Die strahlungsinduzierte mRNA-Expression von asTF in HUVECs in Abhängigkeit von der Strahlendosis. (I:SEM) $^{\ddagger}P < 0,007$ vs. Kontrolle

Die Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalyse von asTF sind in Abbildung 41 dargestellt. Es zeigte sich, dass allein die mit 10 Gy bestrahlten Zellen ab dem 7. Tag nach Bestrahlung signifikant mehr TF als die entsprechenden unbestrahlten Zellen hatten. Im Einklang mit der „full-length“ Variante wurden auch für die mRNA-Expression der Isoform an Tag 15 die höchsten Werte gemessen.

4.3.2 Die zelluläre Protein-Expression und Aktivität von TF nach Bestrahlung

Die zelluläre TF-Protein-Konzentration wurde in den drei Gruppen (Kontrolle, 5 Gy, 10 Gy) im betrachteten Zeitfenster mittels ELISA untersucht. Hierbei ergab sich, dass bereits drei Tage nach Bestrahlung gegenüber den unbestrahlten Kontrollen eine signifikant erhöhte Konzentration an TF in den Endothelzellen zu finden war. Im weiteren Verlauf stiegen die Konzentrationen in beiden bestrahlten Gruppen stetig an, wobei in den mit einer höheren Dosis (10 Gy) bestrahlten HUVECs durchweg mehr TF detektiert wurde als in den Zellen, die mit 5 Gy bestrahlt wurden. Im Vergleich mit den unbestrahlten Zellen wurde am siebten Tag nach Bestrahlung in der 10 Gy-Gruppe eine knapp sechsfache Erhöhung gemessen. In der 5 Gy-Gruppe hingegen wurde nur ein vierfacher Anstieg an TF-Protein verzeichnet.

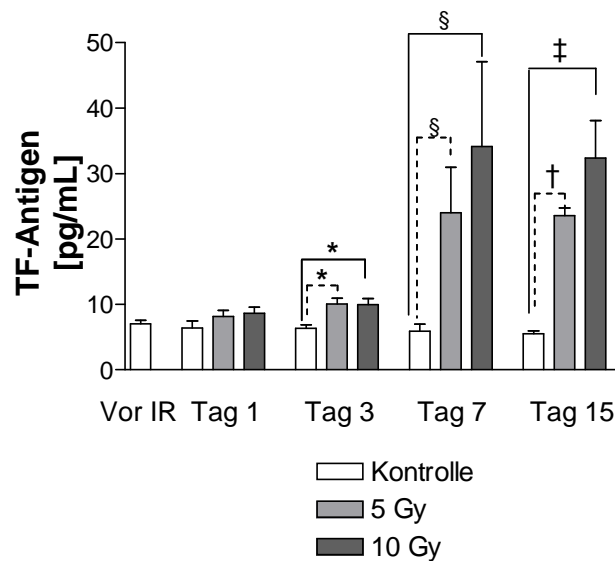


Abbildung 42 Die zelluläre TF-Konzentration vor und nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen. (I:SEM) [†] $P < 0,0001$, [‡] $P < 0,005$, ^{*} $P < 0,02$, [§] $P < 0,05$

Bei Betrachtung der prokoagulatorischen Aktivität der bestrahlten HUVECs (Abbildung 43) ergab sich ein ähnliches Bild wie für die Protein-Konzentration. Auch die TF-vermittelte Umsetzung von F X zu F Xa nahm ab dem 3. Tag in beiden

bestrahlten Gruppen signifikant gegenüber den unbestrahlten Zellen zu, wobei die Bestrahlung mit 10 Gy in einem stärkeren Anstieg der prokoagulatorischen Aktivität resultierte als die mit 5 Gy.

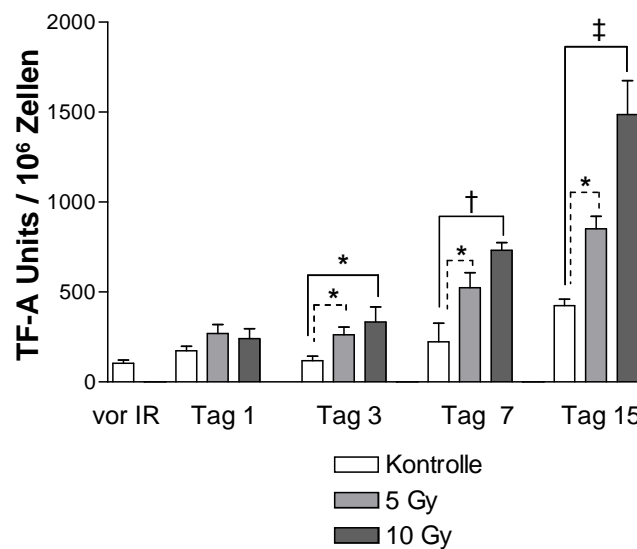


Abbildung 43 Die Zunahme der TF-Aktivität nach Bestrahlung von HUVECs über 15 Tage. (I:SEM)
 $^{\dagger}P < 0,0001$, $^{\ddagger}P < 0,005$, $^*P < 0,02$

4.3.3 Der Effekt von TNF- α auf die strahlungsinduzierte Sekretion von asTF

Da die Bestrahlung mit 5 Gy keinen signifikanten Effekt auf die asTF-mRNA-Expression hatte, wurden die folgenden Experimente nur noch mit der höheren Strahlendosis durchgeführt. Wie bereits auf mRNA-Ebene (Abbildung 41) gezeigt wurde, führte die Bestrahlung mit einer Dosis von 10 Gy zu einer signifikant erhöhten Expression von asTF sieben Tage nach Bestrahlung (Abbildung 44). Dieser Effekt konnte auf Protein-Level anhand der Aktivitätsmessung im Zellkultur-Überstand verifiziert werden. Dass die Aktivität tatsächlich von der löslichen TF-Isoform herrührt, wurde wie bereits in Abschnitt 4.1.7 beschrieben durch Immunpräzipitation mit asTF-spezifischen Antikörpern sichergestellt.

Die Stimulation mit TNF- α führte in dieser Versuchsreihe zu einer Erhöhung der prokoagulatorischen Aktivität auf $7,92 \pm 0,33$ U in unbestrahlten Zellen, wohingegen

die Stimulation mit TNF- α nach vorausgegangener Bestrahlung in eine gegenüber der unbestrahlten Probe noch weiter verstärkten Aktivität ($8,47 \pm 0,28$ U, $P < 0,03$, Abbildung 44) resultierte.

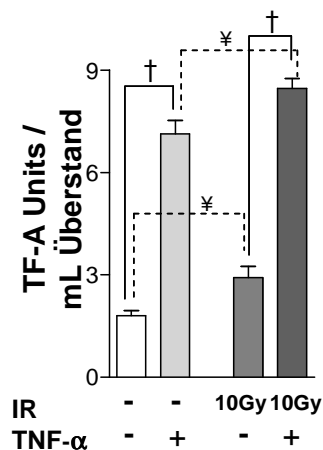


Abbildung 44 Die prokoagulatorische Aktivität im Mikropartikel-freien Überstand unbestrahlter und bestrahlter (10 Gy) HUVECs vor und nach Stimulation mit TNF- α . (I:SEM) $^{\dagger}P < 0,0001$, $^{\text{¥}}P < 0,03$

4.3.4 Die Auswirkung von TNF- α auf die Mikropartikel-assoziierte prokoagulatorische Aktivität bestrahlter HUVECs

Die Stimulation mit TNF- α führte in zuvor unbehandelten Zellen zu einem Anstieg der extrazellulären prokoagulatorischen Aktivität: zum einen durch die Sekretion von löslichem asTF (Abschnitt 4.1.7.4), zum anderen durch die Abschnürung von TF-exponierenden Mikropartikeln (Abschnitt 4.1.7.5). Am siebten Tag nach Bestrahlung (10 Gy) wurde nur eine geringe prokoagulatorische Aktivität der Mikropartikel unstimulierter HUVECs ($4,04 \pm 0,56$ U) nachgewiesen (Abbildung 45). Allerdings ließ sich die Aktivität durch Stimulation mit TNF- α signifikant steigern. Die Kombination aus Bestrahlung und inflammatorischem Reiz führte zu einer starken Absonderung prokoagulatorischer Mikropartikel. Die Mikropartikel-assoziierte Aktivität stieg von $4,04 \pm 0,56$ U auf $76,63 \pm 7,35$ U ($P < 0,001$, Abbildung 45).

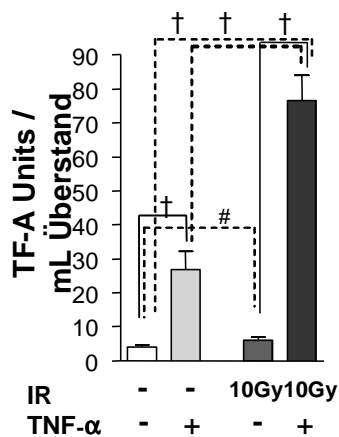


Abbildung 45 Die Mikropartikel-assoziierte prokoagulatorische Aktivität im Zellkultur-Überstand nach Bestrahlung und TNF- α Stimulation. (I:SEM) $^{\dagger}P < 0,001$, $^{\#}P < 0,05$

In Anbetracht der von den Mikropartikeln ausgehenden prokoagulatorischen Aktivität scheint die alternativ gespleißte TF-Isoform für die Prokoagulabilität nach Bestrahlung und Inflammation nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

4.3.5 Der Zusammenhang zwischen strahlungsinduzierter Apoptose und Freisetzung prokoagulatorischer Mikropartikel

Da Mikropartikel Fragmente apoptotischer bzw. aktivierter Zellen darstellen, sollte als nächstes untersucht werden, ob die erhöhte Freisetzung von prokoagulatorischen Mikropartikeln auf eine Zunahme der endothelialen Apoptose zurückzuführen war. Dazu wurden zum einen durchflusszytometrische, zum anderen immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen bestrahlter und unbestrahlter HUVECs vor und nach Stimulation mit TNF- α durchgeführt.

Apoptose wurde in den durchflusszytometrischen Untersuchungen durch Färbungen mit Antikörper gegen aktive Caspase-3 nachgewiesen. Darüber hinaus wurde die prokoagulatorische Aktivität der freigesetzten Mikropartikel bestimmt.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigten, dass in bestrahlten Endothelzellen, die zusätzlich mit TNF- α stimuliert wurden, signifikant mehr aktive Caspase-3 vorhanden war als in unbehandelten Kontrollzellen (Abbildung 46). Der Gehalt an aktiver Caspase-3 korrelierte positiv mit der prokoagulatorischen Aktivität der freigesetzten Mikropartikel ($r^2=0,524$, $P<0,01$, $n=31$).

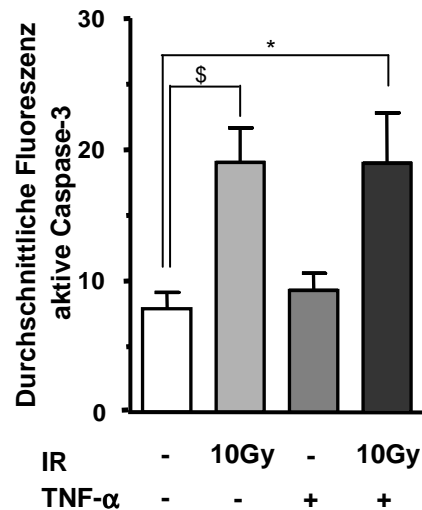


Abbildung 46 Die durchflusszytometrische Untersuchung des Apoptose-Markers aktive Caspase-3 in bestrahlten und mit TNF- α stimulierten HUVECs. (I:SEM) * $P<0,005$, $^{\$}P<0,05$

Bei der immunfluoreszenzmikroskopischen Analyse wurden zur Detektion der Apoptose Antikörper, die sich gegen das PARP (Poly-ADP-Ribose Polymerase) p85 Fragment richten, verwendet. PARP ist ein 116 kDa großes Enzym, das an DNA-Strangbrüche bindet und dadurch enzymatisch aktiv wird. PARP wird während der Apoptose durch Aspartat-spezifische Cysteinproteasen (Caspasen) in zwei Fragmente (85 und 29 kDa) spezifisch gespalten. Da der Antikörper spezifisch das 85 kDa große Fragment erkennt und nicht mit dem ungespaltenen Enzym reagiert, ist er zur Detektion der Apoptose geeignet.

Des Weiteren wurden die Präparate auf TF-Protein hin untersucht, um Veränderungen der TF-abhängigen Prokoagulabilität aufzuzeigen, die im Zusammenhang mit der Bestrahlung sowie der Stimulation mit TNF- α stehen.

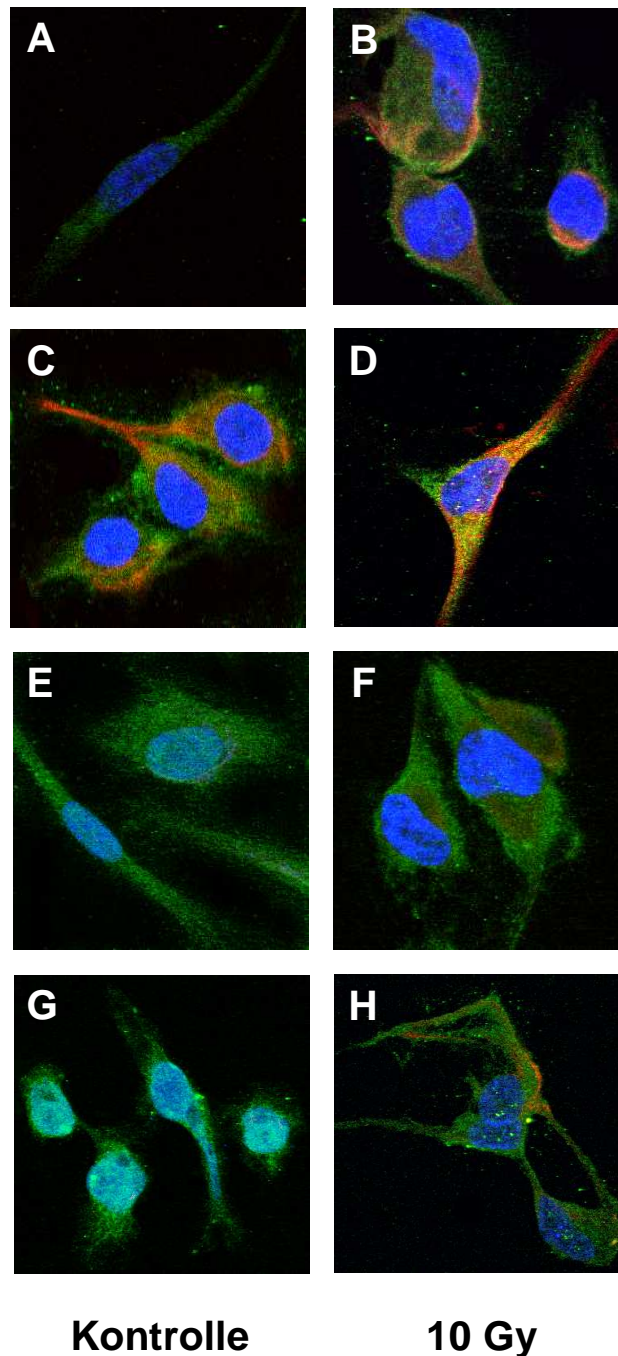


Abbildung 47 Der Einfluss von PDTTC auf die strahlungs- und Zytokin-induzierte TF Expression und Apoptose in HUVECs. Die Abbildung zeigt immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen unbestrahlter (A, C, E, G) und bestrahlter HUVECs (B, D, F, H) vor und nach Stimulation mit TNF- α (10 ng/mL) am siebten Tag nach Bestrahlung. Zellulärer TF ist in grün, PARP p85 Fragment in rot und Zellkerne in blau dargestellt. Eine Gelbfärbung kennzeichnet die Kolo-kalisation von TF und PARP p85 Fragment. Die Zellen in Bild A + B sind weder mit PDTTC, noch mit TNF- α behandelt. Abbildungen C, D, G, H zeigen Färbungen TNF- α -stimulierter Zellen (8 h). PDTTC-vorbehandelte HUVECs (100 μ M) sind in den Bildern E-H dargestellt. Vergrößerung: 630x

Unbehandelte HUVECs zeigten keine Anzeichen von Apoptose und auch die Signale der TF-Färbung waren schwach (Abbildung 47 A). Bestrahlte Zellen hingegen wiesen am siebten Tag nach Bestrahlung sowohl für TF als auch für den Apoptose-Marker PARP p85 Fragment positive Färbungen (Abbildung 47 B).

Eine zusätzliche Stimulation mit dem inflammatorischen Agens TNF- α ergab bei beiden Färbungen ebenfalls positive Ergebnisse (Abbildung 47 D) und könnte auf eine Potenzierung der Apoptoserate und der zellulären Prokoagulabilität durch TNF- α hindeuten.

4.4 Der Einfluss von Antioxidantien auf die strahlungs- und Zytokin-induzierte Tissue Factor-Expression

4.4.1 Die Wirkung der Antioxidantien PDTC und NAC auf die zelluläre Tissue Factor-Aktivität, die strahlungs- und Zytokin-induzierte Apoptose und die Freisetzung von prokoagulatorischen Mikropartikeln

Es ist seit langem bekannt, dass ionisierende Strahlung und proinflammatorische Zytokine wie TNF- α zur Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies führen, die ihrerseits eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B bewirken. Da Antioxidantien als Radikalfänger fungieren, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, wie sich die antioxidative Behandlung mit Pyrrolidindithiocarbamat sowie N-Acetylcystein auf die strahlungs- und TNF- α -induzierte Apoptose und Prokoagulabilität auswirkt. Hierzu wurden die Endothelzellen eine Stunde vor Bestrahlung mit 100 μ M PDTC bzw. 5mM NAC inkubiert. Die Behandlung mit PDTC bzw. NAC wurde alle 24 Stunden über den gesamten Untersuchungszeitraum wiederholt.

Wie in Abbildung 47 F-H zu sehen ist, führte die Behandlung mit PDTC zu einer Reduktion des PARP p85 Fragment-Signals in bestrahlten und TNF- α -stimulierten HUVECs. Dies weist auf eine Verminderung der Apoptose durch das Antioxidans hin. Zellulärer TF hingegen war weiterhin trotz der antioxidativen Vorbehandlung mit PDTC detektierbar (Abbildung 47 E-H). Messungen der zellulären TF-Aktivität PDTC- bzw. NAC-vorbehandelter HUVECs zeigten, dass die Vorbehandlung mit PDTC die TF-Aktivität sowohl unbestrahlter als auch bestrahlter Zellen erhöhte. Die Vorbehandlung mit NAC führte zu keiner signifikanten Änderung der zellulären TF-Aktivität (Abbildung 48).

Die Messung der Mikropartikel-assoziierten TF-Aktivität ergab ein gegenteiliges Bild:

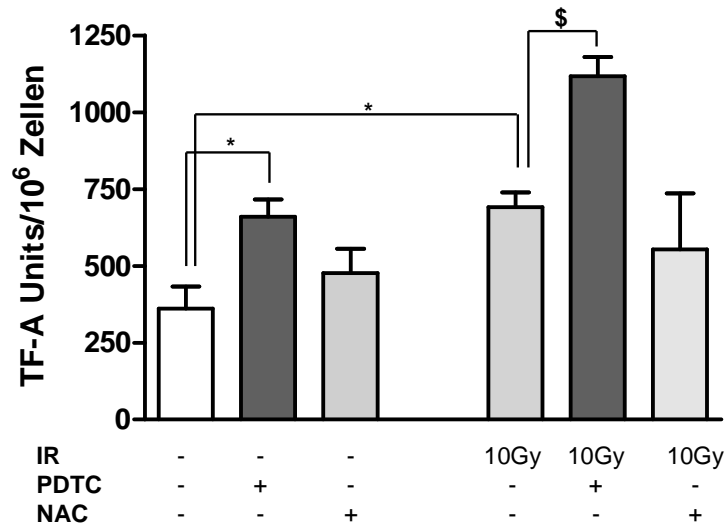


Abbildung 48 Auswirkung der Behandlung mit PDTC und NAC auf die zelluläre TF-Aktivität bestrahlter HUVECs sieben Tage nach Bestrahlung. (I:SEM) * $P < 0,01$, \$ $P < 0,02$

Sowohl die Vorbehandlung mit PDTC als auch die mit NAC führte zu einer signifikanten Reduktion der prokoagulatorischen Aktivität strahlungs- bzw. Zytokin-induzierter Mikropartikel (Abbildung 49).

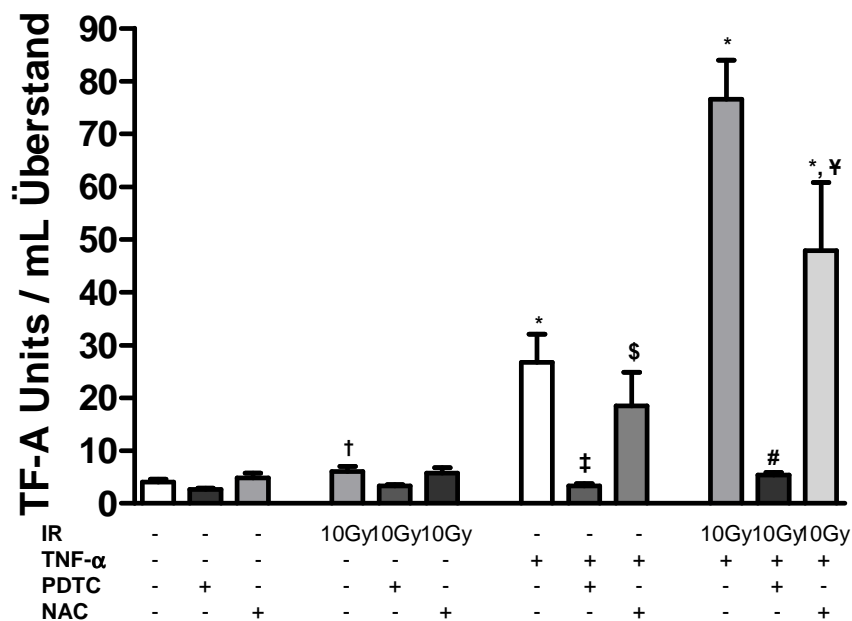


Abbildung 49 Der Einfluss von PDTC und NAC auf die Mikropartikel-assoziierte prokoagulatorische Aktivität nach Bestrahlung und TNF- α -Stimulation. (I:SEM) * $P < 0,001$ vs. Kontrolle, † $P < 0,05$ vs. Kontrolle, \$ $P < 0,01$ vs. Kontrolle, ‡ $P < 0,002$ vs. TNF- α , # $P < 0,001$ vs. 10Gy+TNF- α , * $P < 0,01$ vs. 10Gy+TNF- α

Beide Antioxidantien reduzierten außerdem die Entstehung prokoagulatorischer Mikropartikel nach Bestrahlung und gleichzeitiger TNF- α -Stimulation. Die Behandlung mit PDTC erwies sich gegenüber der mit NAC als wirksamer, die Prokoagulabilität des Zell-Überstandes zu inhibieren.

In Abschnitt 4.3.5 wurde bereits beschrieben, dass mit zunehmender Apoptose die prokoagulatorische Aktivität freigesetzter Mikropartikel stieg. Der Einsatz der Antioxidantien PDTC und NAC verringerte die Apoptoserate stimulierter Zellen, wobei die Inhibition durch PDTC im Vergleich zu NAC wie zuvor beschrieben stärker ausfiel (Abbildung 50).

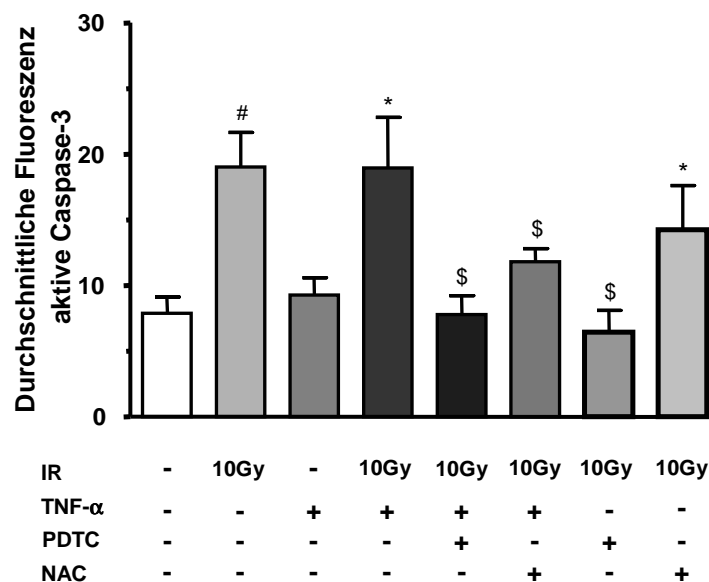


Abbildung 50 Der Einfluss der Antioxidantien PDTC und NAC auf die strahlungs- und TNF- α -induzierte Apoptose in HUVECs. Die Abbildung zeigt die durchflusszytometrische Untersuchung des Apoptose-Markers aktive Caspase-3 an bestrahlten und mit TNF- α stimulierten HUVECs. (I:SEM) ^{\$} $P < 0,01$ vs. Kontrolle, ^{*} $P < 0,005$ vs. Kontrolle, [#] $P < 0,05$ vs. Kontrolle, ^{\$} $P < 0,05$ vs. 10Gy+TNF- α

4.4.2 Die Beteiligung von reaktiven Sauerstoff-Spezies an der Entstehung von prokoagulatorischen Mikropartikeln

Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt wurde, verhindert die Behandlung mit den Antioxidantien PDTC und NAC die Ausschüttung prokoagulatorischer Mikropartikel nach Bestrahlung und TNF- α -Stimulation. Um zu untersuchen, ob die Inhibition der Mikropartikel-Freisetzung auf die antioxidativen Eigenschaften von PDTC und NAC zurückzuführen ist, wurde die Bildung von Sauerstoffradikalen durch Bestrahlung und Zytokin-Stimulation chemiluminometrisch untersucht.

Nach Bestrahlung wurden gegenüber den unbestrahlten Kontrollen in HUVECs signifikant erhöhte ROS-Konzentrationen nachgewiesen (Abbildung 51). Durch eine zusätzliche Stimulation mit TNF- α ließ sich der bereits durch die Bestrahlung erhöhte ROS-Spiegel nochmals signifikant steigern. Die Entstehung von ROS korrelierte positiv mit der Mikropartikel-assoziierten Prokoagulabilität ($r^2=0,675$; $P<0,01$; $n=29$). In Abbildung 51 ist ersichtlich, dass die Bildung von ROS nach Bestrahlung und zusätzlicher TNF- α -Stimulation durch eine Vorbehandlung mit PDTC vollständig unterdrückt werden konnte. NAC hingegen führte nur zu einer minimalen Reduktion.

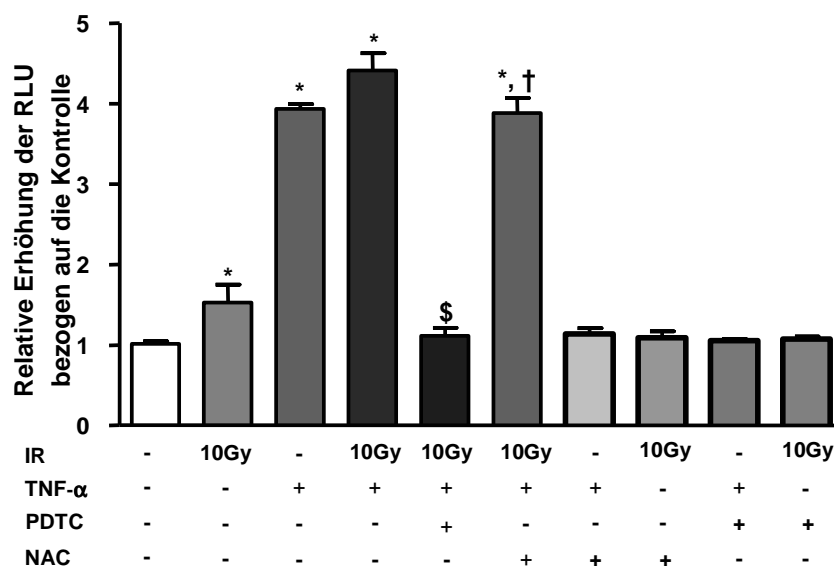


Abbildung 51 Chemiluminometrische Messung der Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies nach ionisierender Strahlung und Stimulation mit TNF- α anhand von relativen Lichteinheiten (RLU) unter der Einfluss von PDTC bzw. NAC. Die Abbildung stellt die relativen Veränderungen der RLU bezogen auf die unbehandelten Kontrollen dar. Die Experimente wurden am siebten Tag nach Bestrahlung durchgeführt. (I:SEM) * $P < 0,001$ vs. Kontrolle, § $P < 0,001$ vs. 10Gy+TNF- α , † $P < 0,05$ vs. 10Gy+TNF- α .

Somit zeigten diese Untersuchungen, dass die Entstehung von ROS mit einer Freisetzung prokoagulatorischen Mikropartikel assoziiert ist.