

5. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass humane Endothelzellen nach Stimulation mit inflammatorischen Zytokinen TF und die alternativ gespleißte TF-Isoform differenziell exprimieren. Sowohl alternativ gespleißter TF als auch TF-exponierende Mikropartikel wurden von den Zellen in den Überstand sezerniert und trugen zur Thrombogenität desselben bei. Die im Verhältnis zu „full-length“ TF geringe Expression von asTF sowie sein frühes Auftreten im Zellkultur-Überstand werfen Fragen nach der Bedeutung der löslichen TF-Isoform unter physiologischen Bedingungen auf.

5.1 Die endotheliale Expression von Tissue Factor unter inflammatorischen Bedingungen

Seit langem ist bekannt, dass TNF- α ein starker Induktor von „full-length“ TF in Endothelzellen ist (Nawroth und Stern, 1986; Scarpati und Sadler, 1989). Die Transkriptionsfaktoren AP-1, ein Heterodimer bestehend c-Jun und c-Fos, vor allem aber NF- κ B, ein Heterodimer bestehend aus verschiedenen Untereinheiten wie z. B. p50 und p65, wurden für die TNF- α -induzierte Transkription des TF-Gens identifiziert und gelten seither als essentiell für die TNF- α -induzierte TF-Expression (Bierhaus et al., 1995). Abbildung 52 zeigt schematisch, wie nach heutigem Stand die beiden Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B durch TNF- α aktiviert werden (Madge und Pober, 2001; Shaulian und Karin, 2002): TNF- α bindet an seinen Rezeptor TNFR-1, wodurch über das Adapterprotein TRADD die Adaptermoleküle TRAF2/5 und RIP1 zum Rezeptor rekrutiert werden. TRAF2/5 und RIP1 führen über die Aktivierung der Proteinkinasen JNK und p38 zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1. Der NF- κ B-Signaltransduktionsweg hingegen wird über eine Phosphorylierung von I κ B-Kinasen (IKK) aktiviert. Die aktivierten Kinasen sind ihrerseits in der Lage, I κ B zu phosphorylieren, wobei diese ihre inhibitorischen Eigenschaften verlieren und sich von den NF- κ B-Dimeren trennen. Die NF- κ B-Dimere können nunmehr in den Zellkern translozieren und dort an die NF- κ B-Bindungsstelle des TF-Promotors

binden. Ferner wurde beschrieben, dass die TNF- α -induzierte Aktivierung von NF- κ B ebenfalls über ROS vermittelt wird. Jedoch ist der genaue Mechanismus noch nicht vollständig geklärt (Garg und Aggarwal, 2002).

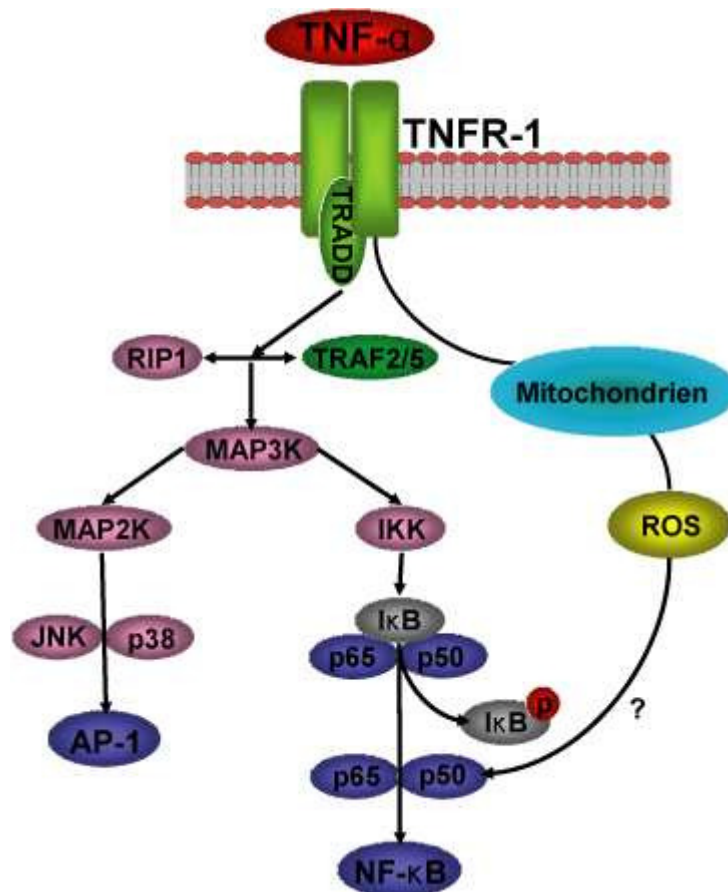


Abbildung 52 Schematische Darstellung der Faktoren, die an der TNF- α -induzierten Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B beteiligt sind. Die Bindung von TNF- α an seinen Rezeptor TNFR-1 resultiert in der Rekrutierung von TRAF2/5, RIP1 über das Adapterprotein TRADD. TRAF2/5 und RIP1 führen zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B über die Aktivierung der Proteinkinasen JNK, p38 and IKK. Die Aktivierung von NF- κ B durch ROS ist noch nicht vollständig geklärt. Abkürzungen: IKK, I κ B Kinase; JNK, c-Jun N-terminale Kinase; MAPK, Mitogen aktivierte Protein Kinase; RIP1, Rezeptor-interagierendes Protein 1; ROS, reaktive Sauerstoff-Spezies; TNF- α , Tumor Nekrose Factor- α ; TNFR-1, TNF Rezeptor Typ 1; TRADD, TNF-Rezeptor-assoziierte Death Domain; TRAF2/5, TNF-Rezeptor-assoziiertes Faktor 2/5. Modifiziert nach Shaulian und Karin, 2002.

In der vorliegenden Arbeit erwies sich das proinflammatorische Zytokine IL-6 im Gegensatz zu TNF- α als ein schwacher Induktor der TF-Expression. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass durch IL-6 nur eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1, nicht jedoch von NF- κ B erfolgt. IL-6 interagiert nach Bindung an seinen Rezeptor mit dem auf den Endothelzellen befindlichem Glykoprotein 130, worauf der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg aktiviert wird (Heinrich et al., 1998). Darüber hinaus wurde auch eine direkte Interaktion von IL-6 mit dem Glykoprotein 130 beschrieben (Mullberg et al., 2000). Der JAK/STAT-Weg führt letztendlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (Mathey-Prevot und Perrimon, 1998). Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, führte die Inhibition des NF- κ B-Signaltransduktionsweges zu einer fast vollständigen Hemmung der TF-Expression in Endothelzellen, was darauf hindeutet, dass die TF-Expression in HUVECs hauptsächlich über NF- κ B induziert wird. Die alleinige AP-1-Aktivierung könnte daher die geringe mRNA-Expression von TF nach Stimulation mit IL-6 erklären.

5.2 Die Bedeutung der Tissue Factor-Isoformen für die Thrombogenität

Die Entdeckung der alternativ gespleißten Isoform entfachte erneut die Diskussion darüber, ob TF tatsächlich in aktiver Form im Blut zirkulieren kann. Kürzlich wurden 10 bis 30 % des im menschlichen Plasma detektierbaren TF-Antigens auf die alternativ gespleißte TF-Isoform zurückgeführt (Bogdanov et al., 2003; Hathcock, 2004). Ihre Plasmakonzentration beträgt ca. 0,5 pM (Osterud und Bjorklid, 2006). In Thromben, die durch Perfusion von Blut über Kollagen beschichtete negativ geladene Oberflächen *ex vivo* generiert wurden, ließ sich nicht nur TF (Giesen et al., 1999), sondern auch asTF nachweisen (Bogdanov et al., 2003). Das deutet darauf hin, dass beide Isoformen im zirkulierenden Blut vorkommen. Auch in anderen Spezies wurden sowohl TF und seine Spleißvariante im zirkulierenden Blut nachgewiesen (Bogdanov et al., 2006). Butenas und Mann hingegen bezweifeln, dass funktioneller TF in Konzentrationen von bis zu 35 pM, wie in einigen Publikationen beschrieben wurde (So et al., 2003), im Blut oder Plasma von gesunden Probanden vorkommen kann, da bereits die Zugabe von 20 fM TF zu frischem, nicht-antikoaguliertem Blut zu einer signifikanten Verkürzung der Gerinnungszeit führe (Butenas und Mann, 2004). Diese Versuche lassen jedoch den Einfluss der laminaren Schubspannung des zirkulierenden Blutes („shear stress“) *in vivo* außer Acht (Baumgartner et al., 1980). Da rekombinanter humaner asTF selbst in supraphysiologischen Konzentrationen (40 nM vs. 0,5 pM *in vivo*) nur eine begrenzte prokoagulatorische Aktivität aufwies (Bogdanov et al., 2003), wurde sein Beitrag zur Thrombogenität gänzlich in Frage gestellt. Vielmehr wurde ihm eine inhibitorische Funktion zugesprochen, indem er aktivierten F VII abfängt und in einem inaktiven Komplex bindet (Butenas und Mann, 2004). Auf Grund der Tatsache, dass die verwendeten Proben aus Aufbereitungen von *E. coli* entstammten und somit keine posttranslationale Faltung erfuhren, wäre es durchaus möglich, dass die prokoagulatorische Aktivität des rekombinanten asTF unterschätzt wurde (Bogdanov et al., 2004). In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit, in der die TF-Isoform in eukaryotischen Zellen überexprimiert wurde, konnte allerdings keine prokoagulatorische Aktivität für asTF festgestellt werden (Censarek et al., 2007). Da die TF-Isoform in der Arbeit von Censarek et al. nicht in den Überstand sezerniert

wurde, ist denkbar, dass asTF dort in einer anderen Konformation vorlag und dadurch keine prokoagulatorische Aktivität entwickeln konnte (Mackman, 2007).

Rekombinanter humaner asTF (aus *E. coli*) allein zeigte nur eine minimale prokoagulatorische Aktivität. Jedoch wurden in einer phospholipidreichen Umgebung höhere Aktivitätswerte gemessen (Bogdanov et al., 2003). Diese Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit auch für die native Form von asTF bestätigt (Abschnitt 4.1.7.2). Frühere Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass ein Einschluss von TF in eine phosphatidylserinhaltige Phospholipid-Doppelschicht essentiell war, um volle Funktionalität bezüglich der TF-Aktivität zu erlangen, wobei das Fehlen von Phospholipiden die Bindungsaffinität von TF zu F VIIa nicht beeinflusste (Ruf et al., 1991a). Die Rekrutierung von asTF zu phospholipidreichen Membranoberflächen könnte diesbezüglich als Aktivierungsmechanismus der löslichen TF-Isoform dienen. Es ist bekannt, dass transmembranärer TF auf Zelloberflächen weitestgehend in dimerisierter Form vertreten ist, was sich auf sein prokoagulatorisches Potential auswirkt (Bach, 2006). Bislang wurde noch nicht untersucht, ob dies auch für asTF zutrifft: So unterband der Austausch der nativen, transmembranären Domäne von TF gegen einen anderen Membranverankerungsbereich ohne Homologie zu dem von TF seine Dimerisierung, jedoch nicht seine Aktivität (Paborsky et al., 1991; Roy et al., 1991). Diese Arbeiten verdeutlichten noch einmal die Wichtigkeit der Phospholipide (nicht der transmembranären Domäne) für die TF-Aktivität. Ferner wurde in einer Arbeit beschrieben, dass konstruierte, lösliche TF-Ektodomänen, die reversible Dimere bildeten, zu einer Auto-Aktivierung von F VII in der flüssigen Phase führten (Donate et al., 2000). Da die Rekrutierung von potentiell aktivem asTF an die Außenseite eines wachsenden Thrombus seine Propagierung wahrscheinlich begünstigt, könnten stark und dauerhaft erhöhte Plasmaspiegel von asTF einen Risikofaktor für thrombotische Ereignisse darstellen, wodurch asTF eine klinisch relevante Bedeutung als diagnostischer Marker erlangen könnte.

Die Aktivierung von F X ist ohne Phospholipide ineffizient und wird durch negativ-geladene, phospholipidhaltige Oberflächen deutlich verstärkt (Ruf et al., 1991b). Sowohl proinflammatorische Zytokine wie TNF- α als ionisierende Strahlung können die strukturelle Integrität von Zellen beeinträchtigen, indem sie zu einem Verlust der Membranasymmetrie und zu einer Umverteilung der sonst auf der Innenseite der Plasmamembran vorhandenen Phosphatidylserine zugunsten der Außenseite der

Plasmamembran führen (Fadok et al., 2001; Zwaal und Schroit, 1997). Einmal an die Außenseite der Zellmembran gelangt, können Phosphatidylserine somit unterstützend auf die Aktivität des TF/F VIIa-Komplexes an der Zelloberfläche einwirken.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass das proinflammatorische Zytokin TNF- α in HUVECs die prokoagulatorische Aktivität nicht nur durch die Induktion von zellulärem TF, sondern auch von asTF und seiner anschließenden extrazellulären Freisetzung erhöht. Um eine prokoagulatorische Aktivität im Mikropartikel-freien Überstand zu messen, war neben der Zugabe von Phospholipidvesikeln (PC:PS 80:20 w/w) auch eine 20-fach höhere Konzentration an F VIIa notwendig als unter physiologischen Bedingungen ($\sim 0,1$ nM) überhaupt vorhanden ist. Die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung eines Komplexes aus asTF und F VIIa scheint demnach *in vivo* eher gering zu sein. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass löslicher TF in Mikropartikel-freiem menschlichen Plasma vorhanden war und zur Thrombinbildung beitrug, die durch rekombinanten F VIIa induziert wurde (Livnat et al., 2006).

Obwohl das L-Lysin-Doppel an den Stellen 165-166, das für die Bindung an F VIIa von großer Bedeutung ist (Kelley et al., 1995; Rao und Ruf, 1995), im alternativ gespleißten TF-Protein erhalten ist, kann die prokoagulatorische Aktivität von asTF gegenüber der „full-length“ Form auf Grund einer veränderten Affinität des gesamten asTF-Moleküles zu F VIIa abweichen. Rekombinanter, löslicher TF (TF₁₋₂₁₈), der allein aus der extrazellulären Domäne von TF besteht, ist in der Lage, F VIIa zu binden. In Druckdissoziationsexperimenten wurde die Dissoziationskonstante für den Komplex aus TF₁₋₂₁₈ und F VIIa, dessen enzymatische Bindungsstelle inhibiert war (FVIIai), bestimmt. In wässriger Lösung wurde ein Wert von 0,59 nM gemessen, wohingegen für den Komplex mit relipidiertem „full-length“ TF eine Dissoziationskonstante von 7,3 pM berechnet wurde (Waxman et al., 1992). Verglichen mit membranverankertem „full-length“ TF wies rekombinanter TF₁₋₂₁₈ eine prokoagulatorische Aktivität von nur 4 % auf (Waxman et al., 1992). Auf Grund der Länge des Proteins (206 Aminosäuren) sowie der veränderten C-terminalen Domäne (40 Aminosäuren) ist von einer geringeren Aktivität auszugehen. Wie sich jedoch das Bindungsverhalten von asTF von F VIIa *in vivo* verhält und welche Aktivität asTF unter physiologischen Bedingungen entfaltet, ist spekulativ und bedarf weiterer Untersuchungen.

TFPI wird als natürlicher Gegenspieler von TF sowohl konstitutiv als auch nach Stimulation aus Endothelzellen sezerniert (Ameri et al., 1992; Lupu et al., 1999; Speiser et al., 2001). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen wurde auch in dieser Arbeit gezeigt, dass TFPI nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen nicht vermehrt exprimiert, sondern vielmehr aus den HUVECs freigesetzt wird und extrazellulär die TF-Aktivität einschränkt. Proinflammatorische Zytokine verändern somit das hämostatische Gleichgewicht der Endothelzellen nicht nur über eine Induktion von prokoagulatorischen Faktoren, sondern auch über Veränderungen an antikoagulatorischen Faktoren. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass TFPI seine direkte Wirkung auch auf asTF entfaltet und in den *in vitro*-Experimenten seine prokoagulatorische Aktivität verminderte. Wie es sich *in vivo* verhält, bedarf weiterer Untersuchungen. Es ist durchaus denkbar, dass sich *in vivo* ein quaternärer Komplex aus asTF, F VIIa, F Xa und TFPI bildet, der indirekt zu einer Erhöhung der Prokoagulabilität führt, indem dem gesamten Blutgerinnungssystem funktioneller TFPI zur Inhibition von „full-length“ TF entzogen wird.

Wie diese Arbeit zeigt, nehmen TF-exponierende Mikropartikel gegenüber der löslichen TF-Isoform asTF besonders nach TNF- α -Stimulation bestrahlter HUVECs, aber auch nach alleiniger Zytokin-Behandlung eine herausragende Rolle ein. Im Hinblick auf die Thrombogenese sind TF-exponierende Mikropartikel dafür bekannt, sich an Thrombozyten anzulagern, was darauf hindeutet, dass „full-length“ TF in unmittelbarer Nähe von Thromben zu einer Potenzierung der Gerinnungsreaktion führt (Giesen et al., 1999; Rauch et al., 2000; Rauch und Nemerson, 2000). In den hier vorgestellten *in vitro*-Experimenten nahm im zeitlichen Verlauf die prokoagulatorische Aktivität der Mikropartikel im Verhältnis zur Aktivität von asTF deutlich zu. Besonders die prokoagulatorische Aktivität der Mikropartikel von bestrahlten und nachfolgend TNF- α -stimulierten Endothelzellen weist darauf hin, dass auf Grund der verminderten Aktivität und des geringen Vorkommens der löslichen TF-Isoform asTF für prokoagulatorische Prozesse nur eine untergeordnete Rolle spielt. Ungeachtet dessen, könnte asTF als sensitiver Marker für eine entzündungsbedingte hämostatische Dysregulation des Endothels Bedeutung erlangen.

5.3 Das Zytokin-induzierte Spleißen des Tissue Factor-Gens und seine Modulierung

Die Stimulation der Endothelzellen mit proinflammatorischen Zytokinen, vor allem nach Stimulation mit TNF- α , resultierte in einer unterschiedlichen Expression von TF und seiner alternativ gespleißten Isoform. Die Behandlung mit TNF- α führte bereits nach zehn Minuten zu einer maximalen mRNA-Expression von asTF, wohingegen die „full-length“ TF-mRNA erst nach sechzig Minuten maximal exprimiert war.

Prä-mRNA Spleißen wird durch unterschiedliche Faktoren reguliert, zu denen unter anderem SR-Proteine zählen, einer Familie hoch konservierter essentieller Spleißfaktoren, die sowohl bei konstitutiven als auch bei alternativen Spleißprozessen eine wichtige Rolle einnehmen (Fu, 1995; Graveley, 2000). Über die SR-Domäne sind Protein-Protein-Wechselwirkungen möglich, die zum einen für die Formierung des Spleißapparates, zum anderen für das Paaren der Spleißstellen essentiell sind (Manley und Tacke, 1996; Wu und Maniatis, 1993). Des Weiteren sind sie für Bindungen an die RNA sowie für die nukleäre Lokalisation in den so genannten „speckles“ mitverantwortlich. SR-Proteine können in Abhängigkeit von ihrer Konzentration die Auswahl von Spleißstellen direkt beeinflussen (Graveley, 2000; Manley und Tacke, 1996). Ferner interagieren sie mit spezifischen Sequenzelementen, die als exonische Spleiß-„Enhancer“ bekannt sind (Blencowe, 2000). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, bietet das Serin-reiche Motiv einen Angriffspunkt für eine Vielzahl von SR-Protein-Kinasen, wie z. B. der Familie der CDC-ähnlichen Kinasen (Colwill et al., 1996; Nayler et al., 1997). *In vitro*-Studien zeigten, dass CLKs spezifisch zur Degradation des SR-Proteins SRp55, nicht jedoch von SC35 führten (Lai et al., 2003). Weiterhin wurde mittels Inhibition der CLKs durch das Benzothiazol-Derivat TG003 alternatives Spleißen moduliert, was auf eine Suppression der CLK-vermittelten Phosphorylierung von SR-Proteinen zurückgeführt wurde (Muraki et al., 2004). Im humanen Exon 5 des TF-Gens existieren Bindungsstellen für SC35 und SRp55 (Bogdanov et al., 2006). Durch den Einsatz des CLK-Inhibitors TG003 konnte in der vorliegenden Arbeit eine vollständige Inhibition der TNF- α -induzierten mRNA-Expression von asTF beobachtet werden.

Die mRNA-Expression von „full-length“ TF auf der anderen Seite wurde nur partiell inhibiert. Somit scheint die CLK-vermittelte SRp55-Phosphorylierung für die Regulation der TF-prä-mRNA-Prozessierung, insbesondere des Zytokin-induzierten alternativen Spleißens, von entscheidender Bedeutung zu sein. Jedoch sind weitere Experimente nötig, um die tatsächliche Rolle der SR-Proteine SRp55 und SC35 für die Regulation des alternativen Spleißens der TF-prä-mRNA zu ergründen. Über welchen Mechanismus TNF- α mit den CLKs interagiert, ist bislang nicht bekannt und bedarf ebenfalls weiterer Untersuchungen.

Als eine weitere mögliche Erklärung für die TNF- α -induzierte Regulation der RNA-Prozessierung kommt eine Aktivierung des p38-MAPK-Signaltransduktionsweges in Betracht, der am Spleißen von prä-mRNA über eine Translokation des Spleißfaktors hnRNP A1 vom Zellkern in das Zytoplasma beteiligt ist (van der Houven van Oordt et al., 2000). Dadurch verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen den Spleißfaktoren hnRNP A1 und ASF/SF2 im Zellkern. Dieses Gleichgewicht spielt eine zentrale Rolle in der Selektion der Spleißstelle (Sun et al., 1993). Da binnen fünf Minuten nach Stimulation mit TNF- α in Endothelzellen die Aktivierung von p38 nachgewiesen wurde (Grethe et al., 2004) und die TF-Isoform, wie hier gezeigt wurde, bereits 10 min nach Stimulation maximal exprimiert war, ist eine Regulation des Spleißens auch über diesen Weg denkbar.

5.4 Der Einfluss ionisierender Strahlung auf die Tissue Factor-Expression und Mikropartikel-Freisetzung

Daten über die Wirkung ionisierender Strahlung bezüglich der TF-Expression in Endothelzellen sind kaum vorhanden. Es wurde lediglich beschrieben, dass ionisierende Strahlung zu einer *de novo*-Synthese von TF in HUVECs führt (Verheij et al., 1995). Ein möglicher Induktionsmechanismus wurde jedoch nicht benannt. Eine Vielzahl von zellulären Effekten ionisierender Strahlung tritt erst mit einer zeitlichen Verzögerung auf (Nagar et al., 2006), wie beispielsweise Apoptose (Shinomiya, 2001). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass nach Bestrahlung die TF-Expression verzögert eintrat. Li und Karin beschrieben eine strahlungsinduzierte, ROS-unabhängige Aktivierung von NF- κ B, die auf eine Aktivierung von IKK zurückgeführt werden konnte (Li und Karin, 1998). Dies erklärt jedoch nicht, weshalb die TF-Expression zeitlich verzögert auftrat. In anderen Arbeiten wurde jedoch gezeigt, dass ROS doch als second messenger an zellulären Modulationen, unter anderem auch an der Aktivierung von NF- κ B, beteiligt sind (Wang et al., 2002). Zudem wurde eine verstärkte ROS-Produktion als ein zeitlich verzögerter, persistierender Effekt bestrahlter Zellen nachgewiesen (Rugo und Schiestl, 2004), was die Hypothese einer ROS-abhängigen, zeitlich verzögerten TF-Expression, wie sie in dieser Arbeit beobachtet wurde, unterstützt. Weitere Experimente müssen zeigen, ob diese Hypothese bestätigt werden kann.

Zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung wurden keine Unterschiede im Verhältnis der mRNA-Expression von „full-length“ TF zu der von asTF ermittelt. In bestrahlten Endothelzellen scheinen somit die Unterschiede in der mRNA-Expression von asTF auf unterschiedliche Transkriptionsraten des TF-Gens zu deuten, jedoch nicht auf eine Regulation des Spleißprozesses, so wie es nach Zytokin-Stimulation den Anschein hat.

In mehreren Arbeiten wurde bereits beschrieben, dass Apoptose mit der Freisetzung von Mikropartikeln aus der Zellmembran assoziiert ist, die prokoagulatorisch wirksam sein können (Banfi et al., 2005; Diamant et al., 2004; VanWijk et al., 2003). TNF- α interagiert mit seinen Rezeptoren und vermittelt darüber unterschiedliche zelluläre Effekte. Wie bereits beschrieben wird durch TNF- α der NF- κ B-

Signaltransduktionsweg über ROS aktiviert, der zu pro-, häufiger jedoch zu antiapoptotischen Zellantworten führen kann (Garg und Aggarwal, 2002). Allerdings ist nicht bekannt, welche Faktoren das Gleichgewicht zwischen den pro- und antiapoptotischen Effekten beeinflussen. TNF- α ist ferner in der Lage, Apoptose über die Aktivierung von Caspasen zu induzieren (Abbildung 53). Auch dieser Weg ist ROS-abhängig. TNF- α induziert eine Freisetzung von ROS aus den Mitochondrien, die über Caspase-Aktivierung zur Apoptose führen (Goossens et al., 1995; Hampton und Orrenius, 1997).

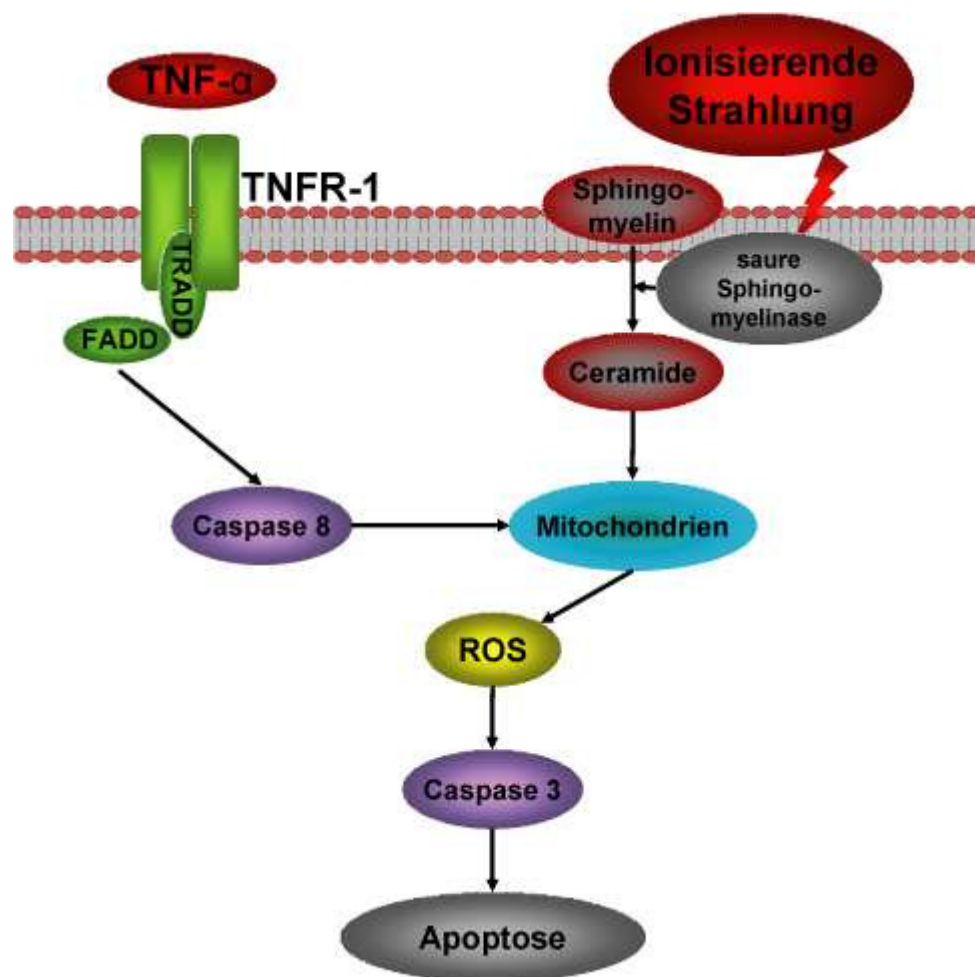


Abbildung 53 Schematische Darstellung der TNF- α - bzw. strahlungsinduzierten Apoptose unter Beteiligung von ROS. Die Bindung von TNF- α an seinen Rezeptor führt zur Aktivierung von Caspase 8, die zu einer Erhöhung der ROS-Formation in den Mitochondrien führt. Ionisierende Strahlung hingegen aktiviert die saure Sphingomyelinase, wodurch in der Plasmamembran befindliches Sphingomyelin hydrolytisch gespalten wird. Die Spaltprodukte Ceramide bewirken ihrerseits eine vermehrte ROS-Produktion in den Mitochondrien. Beide Wege münden in einer ROS-vermittelten Aktivierung der Caspase 3, durch die Apoptose eingeleitet wird.

Ionisierende Strahlung kann ebenfalls über unterschiedliche Wege Apoptose induzieren. So wurden unter anderem DNA-Schädigung, Aktivierung des Tumorsuppressor-Gens p53 sowie Ceramide als Induktoren der Apoptose entdeckt (Billis et al., 1998; Lowe et al., 1993). Ceramide entstehen bei der enzymatischen Hydrolyse von Sphingomyelin durch Aktivierung von Sphingomyelinasen. Die saure Sphingomyelinase kann durch ionisierende Strahlung aktiviert werden (Kolesnick und Fuks, 2003). Ceramide führen in Endothelzellen wie TNF- α zu einer verstärkten Produktion von ROS in den Mitochondrien (Matsunaga et al., 2004), wodurch wiederum eine Aktivierung der Caspase 3 mit darauf folgender Apoptose induziert wird.

Dass die proinflammatorische Behandlung bestrahlter Endothelzellen zu einer so starken ROS- und Apoptose-assoziierten Freisetzung prokoagulatorischer Mikropartikel führt (s. Abschnitt 4.3.4), war bislang nicht bekannt und könnte das Auftreten von Spätthrombosen bestrahlter Patienten erklären, indem die Freisetzung von Mikropartikel-assoziiertem TF zu einer Erhöhung der Thrombogenität von vaskulären Zellen und des Blutes beiträgt.

5.5 Die Wirkung der Antioxidantien PDTC und NAC auf die strahlungsinduzierte Tissue Factor-Expression und Mikropartikel-Entstehung

Trotz struktureller Unterschiede sind PDTC und NAC Radikalfänger und wirken in Zellen durch Modulation des ROS-Metabolismus als potente antioxidative Agenzien (Meyer et al., 1993; Zafarullah et al., 2003). Zudem weist PDTC die ungewöhnliche Eigenschaft auf, gegensätzliche Effekte auf die beiden redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B auszuüben (Kim et al., 2003). So wird AP-1 durch PDTC aktiviert, NF- κ B hingegen inhibiert. Dies könnte der Grund dafür sein, dass in der vorliegenden Arbeit eine zelluläre TF-Induktion durch PDTC beobachtet wurde (Abbildung 47 E + 51). Eine frühere Arbeit beschreibt, dass PDTC allein zu einer Erhöhung der mRNA-Expression von TF führte, gleichzeitig jedoch die TF-Aktivität an der Oberfläche von Endothelzellen reduzierte (Orthner et al., 1995). Der überwiegende Teil des in der Zelle vorhandenen TF liegt verschlüsselt in so genannten „Lipid Rafts“ vor. Es bedarf der Entschlüsselung durch einen Stimulus beispielsweise Apoptose oder Detergenzien, um auf der Zelloberfläche prokoagulatorische Aktivität zu erlangen (Bach, 2006; Greeno et al., 1996). Um die gesamte in der Zelle verfügbare TF-Aktivität und nicht nur die an der Zelloberfläche beurteilen zu können, wurden daher die Endothelzellen mit Detergenzien lysiert und so die vollständige prokoagulatorische Aktivität der Zellen erfasst.

Durch die Vorbehandlung der Zellen mit Antioxidantien konnte die Freisetzung prokoagulatorischer Mikropartikel signifikant reduziert werden, wobei die Reduktion durch PDTC stärker ausgeprägt war als durch NAC. Studien zufolge verhinderte die Inhibition der NF- κ B-Aktivierung durch PDTC sowie durch NAC die Apoptose von Endothelzellen, die durch oxidativen Stress ausgelöst wurde (Aoki et al., 2001; Zafarullah et al., 2003). Weitere Studien zeigten, dass die Bildung von ROS sowohl nach ionisierender Bestrahlung als auch nach Stimulation mit TNF- α durch den Einsatz von Antioxidantien deutlich reduziert und dadurch Apoptose verhindert wurde (Garg und Aggarwal, 2002; Schreck et al., 1992). Eine Arbeit von Zhu et al. beschreibt, dass die antioxidative Wirkung von NAC um das Zwei- bis Dreifache

schwächer ausgeprägt ist als die von PDTC (Zhu et al., 2002), was sich in den Ergebnissen dieser Arbeit widerspiegelt.

Eine antioxidative Begleittherapie könnte sich dennoch als nützlich erweisen, das Thrombose-Risiko nach einer antiproliferativen Behandlung wie der Strahlentherapie zu senken.

5.6 Ausblick

Die physiologische sowie pathophysiologische Bedeutung der alternativ gespleißten TF-Isoform ist bisher unbekannt und bedarf weiterer Untersuchungen. Für thrombotische Ereignisse scheint die lösliche TF-Isoform von nur marginaler Bedeutung zu sein, da das thrombogene Potential von „full-length“ TF bzw. TF-Mikropartikeln um ein Vielfaches höher ist, wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde. Dennoch könnte asTF als klinischer Marker für eine dysregulierte Hämostase bei entzündlichen Prozessen Bedeutung erlangen. Dies gilt es, in weiterführenden Studien zu überprüfen.

Darüber hinaus könnten sich Antioxidantien als nützliche Begleitmedikation erweisen, um über eine verminderte Freisetzung thrombogener Mikropartikel das Thrombose-Risiko nach Bestrahlung zu senken.