

Aus der Medizinischen Poliklinik
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Tissue Factor Expression von Monozyten bei essentieller Hypertonie und
nach Stimulation mit dem AT1-AK

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Matthias Herberg

aus Ravensburg

Gutachter: 1. PD Dr.med. Y. Dörfel
2. Prof. Dr.med. G. Linß
3. PD Dr.med. S. Faiss

Datum der Promotion: 21.04.2008

1.	Einleitung	9
1.1	Definition der arteriellen Hypertonie	9
1.2	Arteriosklerose	11
1.2.1	Definition	11
1.2.2	Bedeutung des Angiotensin II in der Pathogenese der Hypertonie	12
1.2.3	Der Angiotensin II Subtyp 1 Rezeptor	13
1.2.4	Die Rolle des AT1 Rezeptor-Antikörper in der Pathogenese der Hypertonie	14
1.3	Periphere Monozyten	15
1.3.1	Adhäsionsvorgang der Monozyten	16
1.3.2	Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen und Monozyten	17
1.4	Tissue Factor	18
1.5	Nuklearer Faktor κ B	19
1.6	Bedeutung des Gerinnungssystems in der Pathogenese der arteriellen Hypertonie	20
1.7	Therapeutische Aspekte bei essentieller Hypertonie und Arteriosklerose	21
2.	Herleitung der Aufgabenstellung	23
3.	Methodik	25
3.1	Monozytenisolation	25
3.1.1	Blutentnahme	25
3.1.2	Frischblutauarbeitung	25
3.1.3	Zellzählung und Vitalitätsbestimmung	26
3.1.4	Das negativ Isolierungsverfahren	26
3.1.5	Prinzip	27
3.1.6	Monozytenreinheit	28
3.2	Stimulation peripherer Monozyten	29
3.3	Probenaufbereitung	29
3.3.1	Proteinbestimmung	30
3.4	Hypertoniepatienten- und Kontrollgruppe	31
3.4.1	Auswahlkriterien der Studienteilnehmer	31
3.4.2	Hypertoniepatienten	31
3.4.3	Normotensive Probanden	31
3.5	Nachweis von Tissue Factor und ICAM1 mittels Western Blot	34
3.5.1	Elektrophorese	34

3.5.2	Elektrophorese-System	34
3.5.3	Elektrophorese-Gel	34
3.5.4	Versuchsaufbau und Ablauf	35
3.5.5	Konzentrationen der Elektrophorese-Substanzen	36
3.5.6	Wet Blot	37
3.5.7	Versuchsaufbau und Ablauf	37
3.6	Immunchemischer Antigennachweis	38
3.6.1	Inkubation mit primärem und sekundärem Antikörper	38
3.6.2	Konzentrationen der Inkubationssubstanzen	38
3.7	Radiographischer Nachweis der Banden	39
3.7.1	Chemiluminiszenz-Prinzip	39
3.7.2	Radiographische Methode	40
4.	Ergebnisse	41
4.1	Evaluation der Methoden	41
4.1.1	Analyse der Monozytenisolation	41
4.1.2	Vitalität	42
4.1.3	Reinheit	42
4.2	Antikörper Test	43
4.2.1	Spezifität des polyklonalen anti human TF-Antikörper	43
4.2.2	Sekundärantikörpertest gegen den monoklonalen humanen TF-AK (VIC7)	44
4.2.3	Nachweis der Spezifität von human Tissue Factor-AK und ICAM1-AK	45
4.3	Nachweis von Tissue Factor mittels Western Blot	47
4.3.1	Vergleich zwischen Monozyten von Hypertonikern versus Normalkontrollen	47
4.3.2	Statistische Auswertung und Korrelationen der Tissue Factor Studie	49
4.4	Vergleich zwischen AT1-AK stimulierten und unstimulierten Monozyten von Normalkontrollen	55
4.4.1	Vergleich zwischen AT1-AK stimulierten und unstimulierten Monozyten von Hypertonikern	57
4.5	Messung des Adhäsionsmoleküls ICAM1 mittels Western Blot	60
4.5.1	Vergleich zwischen Monozyten von Hypertonikern versus Normalkontrollen	60
5	Diskussion	64
5.1	Rolle der Monozyten bei der Arteriosklerosegenese im Rahmen der essentiellen Hypertonie	64
5.2	Evaluation der Einflussfaktoren	65

5.3	Methodenkritik	66
5.3.1	Beeinträchtigung durch den Isolierungsprozess	66
5.3.2	Beeinträchtigung durch Inkubation	66
5.4	Nachweismethoden und Datenauswertung	66
5.4.1	Lysierung und Proteinbestimmung	67
5.4.2	Standardisierung der Untersuchungsmethode Western Blot	67
5.4.3	Standardisierung der Datenauswertung	68
5.4.4	Auswahl der statistischen Verfahren	68
5.5	Aktivierung und Adhäsion peripherer Monozyten	68
5.6	Tissue Factor Expression bei Hypertonikern	69
5.6.1	Korrelation der Tissue Factor Expression mit den Einflussfaktoren	73
5.7	ICAM1-Expression bei Hypertonikern	73
5.8	Tissue Factor Expression nach AT1-AK Stimulation	75
6	Zusammenfassung	78
7	Literaturverzeichnis	80
8	Danksagung	96
9	Erklärung an Eides statt	97

Abkürzungen :

4-AP	4 - Aminopyridin
A	Ampere
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AGEs	Advanced glycation endproducts
AK	Antikörper
AP-1	Activator protein 1
APC	Allophycocyanin Fluoreszenzfarbstoff
Apc	antigen presenting cells (antigenpräsentierende Zellen)
APS	Amoniumpersulfat
AT1-AK	Angiotensin II Subtyp 1 Rezeptor - agonistischer Antikörper
AT	Angiotensin II
AT1	Angiotensin II Subtyp 1 Rezeptor
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Celsius
CD	Cluster of Differentiation
CRP	C-reaktives Protein
CuSO ₄	Kupfersulfat
ECL-Kit	enhanced chemiluminiscence (Substratlösung für Peroxidase)
EDTA	Ethylen diamine tetraacetic acid
ELISA	Enzym linked immuno sorbent assay
EMSA	Elektro mobility shift assay
Erythrozyten	rote Blutzellen
ET 1	Endothelin 1
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen Colony Stimulating Factor
Fab-Fragment	Fragment antigen binding Fragment
FACS	Fluorescence absorbent cell sorter
Fc-Fragment	Fragment crystalline Fragment
FITC	Floureszin Isothiozyanat-Floureszenzfarbstoff
FL 1/2	Floureszenz
fM	femto Mol
FSC	Forward light scatter
GATE	Bereichsdefinition im FACS
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxyd

HAEC	Human aortic endothelial cell
HCL	Wasserstoff Chlorid
HSA	Humanes Serumalbumin
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
I	Stromstärke
(s)ICAM-1	(soluble – lösliches) Intercellular adhesion molecule-1
IE	Internationale Einheit
Ig	Immunglobulin
IL-1	Interleukin 1
JNC	Joint National Committee
INF γ	Interferon γ
KDa	Kilo-Dalton
LDL	Low density lipoprotein
Leukozyten	weiße Blutzellen
LFA-1	Leukocyte function associated antigen-1
LPS	Lipopolysaccharid
MA	Milli Ampere
MAC-1	Membrane attack complex-1
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein 1 alpha
MM	Milli Mol
MmHG	Millimeter Quecksilber
MNZ	Mononukleäre Zellen
MPC	Magnetic particel concentrator
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumkarbonat
NF κ B	Nuklearer faktor kappa B
NK	Normalkontrollen
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxyd
Ns	Newtonsekunden
OD	optische Dichte
PAF	Platelet activating factor
PAGE	Polyacrylamid gel electrophoresis

PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor - 1
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphat buffered saline
PI	Propium Iodid Färbung
R 1-3	Bereichsdefinition im FACS Histogramm
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RANTES	Regulated on Active Normally T-cell Expressed and Secreted
RIA	Radio-Immunoassay
RNA	Ribonuclein acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkultur Medium)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SHR	Spontan hypertensive Ratten
SSC	Side scatter
TBST	tris buffered saline + Tween 20 (trisgepufferte Salzlösung)
TEA	Tetraethylammonium-Chlorid
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Tissue Factor
TF-AK	Tissue Factor Antikörper
TNF α	Tumor Nekrose Faktor alpha
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TS – Lösung	Trislösung
V	Volt
(s)VCAM-1	(soluble – lösliches) Vascular cell adhesion molecule-1
VOL	Volumen
WHO	World Health Organization

1. Einleitung

1.1 Definition der arteriellen Hypertonie

Die arterielle Hypertonie entspricht einer Druckerhöhung im großen Kreislauf. Sie wird in der Literatur einerseits als Regulationsstörung, andererseits als manifeste Erkrankung beschrieben. Aktuelle Konzepte definieren Hypertonie als ein Syndrom von Risikofaktoren (Neutel JM 2001). Die Prävalenz liegt in den westlichen Industrienationen bei 15–30%, wobei noch ein ähnlich hoher Prozentsatz an unentdeckten Hypertonikern vermutet wird. Ihr Vorkommen ist in Nordjapan am häufigsten, bei dem Ureinwohnern Grönlands, den Inuit, am geringsten.

Die wesentlichen Folgen einer unbehandelten Hypertonie umfassen koronare Herzkrankheit mit Angina pectoris und Myokardinfarkt, hypertensive Herzkrankheit, hypertensive Nephro- und Encephalopathie.

Tab.1 : Klassifikation der Blutdruckwerte nach JNC – VI :

Kategorie	Systolischer Blutdruck (mmHg)	Diastolischer Blutdruck (mmHg)
Optimal	< 120	<80
Normal	<130	85
Hochnormal	130 – 139	85 – 89
milde Hypertonie (Stadium I)	140 – 159	90 – 99
mäßige Hypertonie (Stadium II)	160 – 179	100 – 109
schwere Hypertonie (Stadium III)	≥180	>110

Die Hypertonie ist die Folge eines erhöhten Herzzeitvolumens, eines erhöhten Widerstandes oder beider Faktoren. Unabhängig von klinischen und pathophysiologischen Klassifikationen gilt nach internationaler Übereinkunft (WHO-Expertengremien, International Society of Hypertension) ein Blutdruck von 140/90 als hyperton. Dieser Grenzwert ist willkürlich festgelegt, reflektiert jedoch epidemiologisch und klinisch mit zunehmender Blutdruckhöhe ein deutliches Ansteigen der Inzidenz kardiovaskulärer Folgeerscheinungen, sowie eine Zunahme von Morbidität und Mortalität. Das „*Joint National Committee on prevention, detection, evaluation and treatment of hypertension*“ (JNC) der Vereinigten Staaten gibt einen durchschnittlichen Blutdruck von 120-130 mmHg systolisch und 80-85 mmHg diastolisch als optimalen Größenbereich für die Erwachsenenbevölkerung an, wobei die Grenze über die Jahre ständig nach unten korrigiert wurde (Scholze J 1999). Die aktuelle Klassifikation des JNC definiert Blutdruckwerte zwischen 120-139 mmHg als Prähypertension, die vorwiegend durch Änderung des Lebensstiles behandelt wird. Das Stadium I definiert einen Blutdruckbereich zwischen 140 –159 mmHg und das Stadium II einen Blutdruckbereich zwischen 160 mmHg und höher (JNC VII).

Die weitere, spezifische Unterteilung des JNC fasst optimale, normale und hochnormale Werte in einem A-Bereich, sowie hypertone Werte in einem B-Bereich zusammen und unterteilt die arterielle Hypertonie in eine milde (Stadium I), mäßige (Stadium II) und schwere Form (Stadium III). International orientiert man sich zunehmend an dem individuellen Risikoprofil des Patienten und teilt diese in Gruppen mit normalem, hohem und sehr hohem Risiko ein.

Klinisch wird in eine primäre (90-95%) und in eine sekundäre Hypertonie (5-10%) unterteilt, der vorwiegend eine renale (Glomerulonephritiden, Niereninsuffizienz), endokrine (Phäochromozytom, Cushing-Syndrom, Hyperthyreose) und insbesondere kardiovaskuläre (Aortenklappeninsuffizienz, Aortenisthmusstenose) Störung zu Grunde liegt. Der primären Hypertonie konnte bisher noch kein pathomorphologisches Korrelat zugeordnet werden. Ihre Ätiologie ist vielschichtig und im Einzelnen noch nicht geklärt.

Die entscheidende Rolle des Endothels in der Entwicklung der Arteriosklerose ist allgemein bekannt. Laut der Virchow-Trias sind die Endothelläsionen eine Voraussetzung der Thrombosegenese. Im Verlauf einer essentiellen Hypertonie können druckbedingte Läsionen des Gefäßendothels auftreten und somit die Entwicklung der Arteriosklerose begünstigen. Die Zunahme der Intima Media Dicke verringert das Lumen und erhöht den Widerstand. Konsekutiv ist ein erhöhter Perfusionsdruck erforderlich. Somit ist es naheliegend, die

arterielle Hypertonie bei der Pathogenese der Arteriosklerose als ursächlichen Faktor zu betrachten (Simon A 1995, Violi F 1996).

Die aktuelle medikamentöse Therapie basiert in erster Linie auf der Unterbindung gefäßkonstringierender Effekte. Dieser Angriffspunkt ist eng an die Relaxationsmöglichkeit der Gefäße gekoppelt und verliert bei progredienter Arteriosklerose an Effizienz.

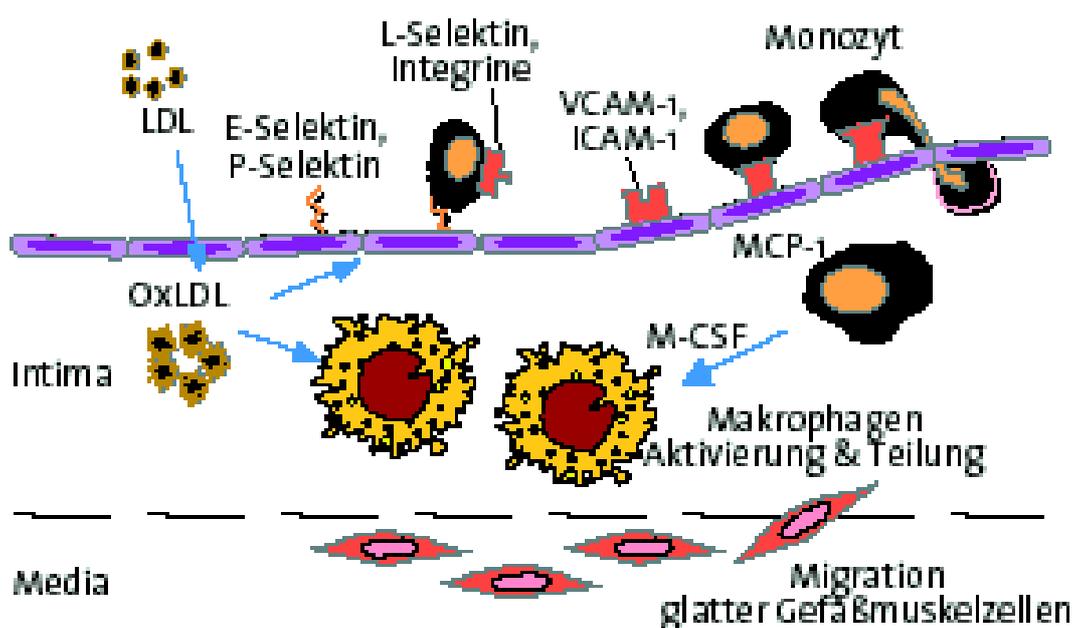
Somit ist die Aufklärung zellulärer und molekularer Mechanismen unumgänglich für die Entwicklung zukünftiger diagnostischer und therapeutischer Verfahren.

1.2 Arteriosklerose

1.2.1 Definition

Die Arteriosklerose ist nach WHO Definition eine variable Kombination von Intimaveränderungen, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Calciumeinlagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia (Kjeldsen SE 2001). Sie ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Arterienwand auf dem Boden wiederholter oder persistierender Reizung und Schädigung durch endo- und exogene Noxen. Unterschiedliche Theorien bezüglich der Pathogenese beziehen sich auf hämodynamische, biochemische und zelluläre Komponenten.

Abb.1 : Interaktion zwischen Endothel und Monozyten



Quelle : Cardiovasc 2003

In den frühen Stadien der Arteriosklerose steht die Dysfunktion und Aktivierung des Endothels im Vordergrund (Kensuke E 2002). In der Folge kommt es zu einer Adhäsion von Monozyten. Diese Zellen wandern in die Intima ein und nehmen über einen spezifischen Rezeptor, den Scavenger-Rezeptor, oxidiertes LDL (low density lipoproteine) auf. Die anschließende Transformation der Monozyten zu Schaumzellen gilt als der initiale Prozess in der Entwicklung der Arteriosklerose (Faggiotto A 1984). Außerdem wird die Produktion und Synthese von Wachstumsfaktoren und Zytokinen gesteigert (Dörffel Y 2001). Dies hat zum einen eine Vasokonstriktion aufgrund mangelnder NO-abhängiger Relaxationsmöglichkeiten, zum anderen eine gesteigerte Plättchenaggregation, die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und die Synthese von Kollagen zur Folge. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Leukozytenadhäsion- und Invasion und zu Calciumeinlagerungen. Pathomorphologisches Korrelat ist letztendlich ein arteriosklerotischer Plaque.

Zu den an der Pathogenese beteiligten Faktoren zählen in erster Linie die arterielle Hypertonie, Stoffwechselerkrankungen (Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie) und Nikotinabusus. Weiterhin spielen Infektionen durch virale und bakterielle Erreger (Coxsackie, Herpes simplex bzw. Helicobacter pylori, Chlamydia pneumoniae), sowie eine familiäre, genetisch bedingte Disposition eine Rolle (Kadar A 2001). Angeborene oder erworbene Störungen des Gerinnungssystems und der Thrombozytenfunktion prädisponieren zur Arteriosklerose. Als weitere Risikofaktoren sind die Einnahme steroidaler Medikamente, wie z.B. Ovulationshemmer, Cortison, und Alkoholabusus zu nennen (Lüscher TF 1995).

1.2.2 Bedeutung des Angiotensin II in der Pathogenese der Hypertonie

Das RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System) reguliert den Blutdruck, den Elektrolyt- und den Flüssigkeitshaushalt. Sein Ursprung liegt in den granulierten Zellen im juxtaglomerulären Apparat der Niere. Die Aktivierung erfolgt zum einen über eine Minderdurchblutung jeglicher Art, zum anderen über die β - bzw. indirekt über die α -adrenerge Innervation durch das vegetative Nervensystem.

Die Protease Renin spaltet von dem hepatisch synthetisierten Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I ab, welches wiederum durch das Angiotensin converting Enzym zu Angiotensin II metabolisiert wird. AT führt zur Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde. Beide Substanzen wirken hemmend auf die Reninfreisetzung.

AT gilt als die stärkste vasokonstriktorische Substanz des Organismus. Dieser Effekt wird sowohl direkt an den Arteriolen oder indirekt über die Stimulierung des zentralen Kreislaufzentrums vermittelt. In der Niere wirkt AT ebenfalls konstriktorisch und beeinflusst die renale Durchblutung und die glomerulären Filtrationsrate. Neben dem zirkulierenden AT besteht ein weiterer Pool an lokal generiertem AT. Über diesen Pool werden die weniger bekannten apoptotischen, proliferativen, und proinflammatorischen Effekte vermittelt (Luft FC 2001).

Nach der Bindung an die entsprechenden AT1- und AT2-Rezeptoren werden apoptotische Vorgänge in Myozyten aktiviert (Cigola E 1997). Als Wachstumsfaktor vermittelt AT die Proliferation von vaskulären Bindegewebs- und Muskelzellen (Keidar S 1998; Daemen MJ 1991; Gibbons GH 1992). Es induziert eine direkte Tissue Factor Expression und Aktivierung von dem nuklearen Faktor κB in Monozyten (Nishimura H 1997; He M 2006). Dieser Transkriptionsfaktor ist für die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Monozyten und Endothelzellen verantwortlich (Müller D 2000). Dadurch lässt sich erklären, warum AT stimulierte Monozyten sowohl einen gesteigerten Aktivierungsgrad als auch eine erhöhte Adhärenz an Endothelzellen aufweisen (Kim JA 1996).

Die proinflammatorischen Effekte von AT basieren auf einer Proliferation von Lymphozyten und einer erhöhten Interleukinsekretion (Luft FC 2001; Dörffel Y 1999). Weiterhin reguliert AT über Aktivierung der Calcineurin Phosphatase die zelluläre Immunantwort. Dies erklärt den Einsatz von Cyclosporin, einem Calcineurin-Inhibitor, im Rahmen der immunsuppressiven Therapie nach Organtransplantation (Nataraj C 1999).

Die Daten unterstützen die Hypothese, dass AT in der Pathogenese der arteriellen Hypertonie und Arteriosklerose eine bedeutende Rolle spielt.

1.2.3 Der Angiotensin II Subtyp 1 Rezeptor

Angiotensin Rezeptoren sind im gesamten Organismus vorhanden. Sie werden in die Subtypen AT 1–4 unterteilt, wobei der AT1-Rezeptor die physiologisch effektive Form darstellt. Seine Expression ist variabel und über einen negativen Rückkopplungsmechanismus reguliert. Hohe AT Spiegel führen zu einer Abnahme der Rezeptordichte in vivo und in vitro und somit zu einer Reduktion der in Kapitel 1.2.2 beschriebenen Effekte (Homuth V 2000). Gleichzeitig führen aber auch geringe AT Spiegel im Rahmen der Präeklampsie zu einem äquivalenten Blutdruckanstieg. Als Ursache dieses Phänomens wird eine genetisch bedingte Dysregulation des Rezeptors vermutet (Wallukat G 1999).

Die Aktivierung des AT1-Rezeptors erfolgt über G-Protein abhängige second messenger Systeme, wie z.B. die Phospholipasen A2, C und D und Inhibition der Adenylatcyclase (Unger T 1996; Hunyady L 2006). Nach spezifischer Bindung an den AT1-Rezeptor induziert AT ein weites Spektrum an Signalprozessen.

Am Endothel konnte nach AT1-Rezeptor Stimulation eine gesteigerte Radikalentwicklung mit konsekutivem Anstieg der Expression von Adhäsionsmolekülen nachgewiesen werden (Unger T 2002; Carrey RM 2000). Der AT1-Rezeptor vermittelt die Adhäsion von AT stimulierten Monozyten an humane Umbilikalvenen-Endothelzellen. Diese Adhäsion ist bei Hypertonikern im Vergleich zu Normalkontrollen erhöht (Dörffel Y 2001). Im Rahmen weiterer Studien wurde nachgewiesen, dass sich der Subtyp AT2 gegenregulatorisch hinsichtlich der Blutdruck-Effekte am Subtyp AT1 verhält (De Gasparo M 2000). Die Funktion der Rezeptor-Subtypen AT III & IV ist zum bisherigen Zeitpunkt noch nicht vollständig aufgeklärt.

1.2.4 Die Rolle des AT1 Rezeptor-Antikörper in der Pathogenese der Hypertonie

Seit längerer Zeit besteht die Annahme, dass das Immunsystem in die Pathogenese der Hypertonie involviert ist. So wurden bereits 1978 sowohl erhöhte IgG Serumspiegel als auch antinukleäre Autoantikörper im Blut von Hypertonikern gefunden (Kristensen BO 1978).

In letzter Zeit gelang die nähere Spezifizierung dieser Immunglobuline mit der Entdeckung der korrespondierenden Rezeptoren. Exemplarisch induzieren α_1 -adrenergen Autoantikörper vergleichbare positiv chronotrope Effekte am Herzen, wie das direkte Sympathomimetikum Phenylephrin (Luther HP 1996).

Fu 2000 konnte nachweisen, dass die vasokonstriktorischen Effekte am AT1-Rezeptor nicht nur AT vermittelt sind, sondern auch von zirkulierenden AT1-AK (AT1 Rezeptor-Autoantikörper) induziert werden. Es handelt sich dabei um ein Immunglobulin der Klasse IgG (Fu ML 2000).

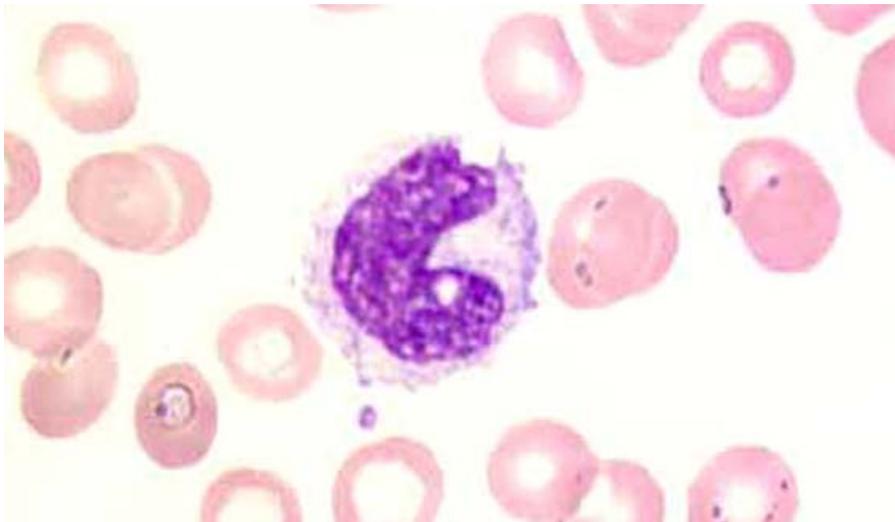
Weiterhin konnte in Seren von Hypertonie- und Präeklampsie Patienten zirkulierende AT1-AK nachgewiesen werden (Wallukat G 1999). Aufgrund der agonistischen Effekte der AT1-AK am AT1-Rezeptor lassen sich die gesteigerte Vasokonstriktion, erhöhte Serumkonzentrationen von Endothelin sowie eine verstärkte Endothelpermeabilität und Sympathikusaktivität erklären. Weiterhin weisen Trophoblasten eine verstärkte Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 (PAI-1) Produktion und verminderte Invasionsaktivität auf (Xia Y 2003). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der AT1-AK für unterschiedliche

Pathomechanismen bei der Hypertonie und Präeklampsie relevant ist (Dechend R 2000; Roberts JM 2000). In der vorgelegten Arbeit wurde untersucht, ob der agonistische AT1-AK die Expression von Tissue Factor auf Monozyten beeinflusst.

1.3 Periphere Monozyten

Monozyten sind ubiquitär vorkommende Zellen und Bestandteil der natürlichen Immunantwort des Organismus. Sie stammen aus dem Knochenmark und sind zur Phagozytose sowie zur Interleukinsynthese befähigt (Cominelli F 1989; Dinarello CA 1996). Ab dem Übergang aus der Zirkulation in das Gewebe werden sie als Makrophagen oder auch Gewebsmakrophagen (Histiozyten) bezeichnet. Diese morphologisch großen Zellen (\varnothing 10-16 μ m) weisen einen hufeisenförmigen Zellkern mit leicht azidophil granuliertem Zytoplasma auf.

Abb. 2 Blutausstrich mit peripherem Monozyt



Der zirkulierende Pool besteht aus Zellen sehr heterogener Ausprägung hinsichtlich der Größe, Form und Expression von Oberflächenantigenen. Der überwiegende Anteil der Zellen befindet sich im peripheren Randstromgebiet und nur ein geringer Prozentsatz bewegt sich im axialen Blutstrom. Die Halbwertszeit im Blut unterliegt starken Schwankungen und beträgt 8h bis 72h.

Monozyten präsentieren ein variables Muster an Oberflächenantigenen. Als spezifisches Merkmal exprimieren sie den CD14-Rezeptor für lipoproteinbindendes Protein der Bakterienmembran (Roitt 1998).

Somit gestaltet sich die Isolierung von Monozyten äußerst schwierig und die Datenlage ist im Vergleich zu Neutrophilen entsprechend spärlich (Shen K 1995).

Die Monozyten sind neben der zellulären Immunantwort auch an der Pathogenese der Arteriosklerose und der arteriellen Hypertonie beteiligt. In vorausgehenden Studien wurde ein erhöhter Aktivierungsgrad bei Monozyten von Hypertoniepatienten nach Messung der Zytokinsekretion nachgewiesen. Dies konnte mittels Messung einer erhöhten Chemilumineszenz bezüglich der Sauerstoffradikal Produktion belegt werden (Dörffel Y 1999). Aktuelle Flußzytometrische Untersuchungen von Oberflächenmolekülen deuten ebenfalls auf eine gesteigerte Aktivierung hin. Zu entsprechenden Ergebnissen kam auch Parissis bei Messung der Entzündungsmarker GM-CSF, MCP-1, MIP-1 α , RANTES, sICAM, sVCAM und ET-1 im Blut von Patienten mit arterieller Hypertonie mittels ELISA und RIA (Parissis JT 2002).

Diese Daten lassen vermuten, dass voraktivierte Monozyten für die Entwicklung der Arteriosklerose bei Hypertoniepatienten verantwortlich sind.

1.3.1 Adhäsionsvorgang der Monozyten

Der Ablauf der Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen wird in drei aufeinanderfolgende und gleichgeschaltete Phasen unterteilt (Kriegelstein CF 2001):

1. „Rolling“ Phase - Monozyten bewegen sich aus dem Zentralstrom in Richtung Gefäßwand. Mediatoren dieser gesteigerten Affinität sind Selektine (L-,P-,E-Selektin) und ihre Liganden, die nach Stimulation durch Zytokine im Rahmen von Entzündungsprozessen exprimiert werden.
2. Adhärenz Phase – durch Integrine und zelluläre Adhäsionsmoleküle (CAM) wird die Adhärenz initiiert. Die Expression der Integrine wird durch Aktivatorsubstanzen vermittelt, wie z.B. Chemokine, bakterielle Peptide und Platelet Activating Factor (PAF).
3. Transmigration – In dieser Phase bewegen sich die Monozyten durch das Endothel unter ständiger Neuausbildung adhäsiver Zellkontakte.

Die Adhäsion von Monozyten an das Endothel ist einer der initialen Vorgänge in der Pathogenese der Arteriosklerose. In tierexperimentellen Studien von McCarron wurde eine erhöhte Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen nach Stimulation mit LPS und pro-entzündlichen Zytokinen beobachtet (McCarron RM 1994). Studien von Menzel konnten sogar zeigen, dass auch nach Inhibition der Zytokinproduktion und der Expression der Adhäsionsmoleküle mittels Ibuprofen die transendotheliale Migration der Monozyten unbeeinflusst bleibt (Menzel EJ 1999). Beim Menschen konnten Studien von Williams einen Zusammenhang zwischen Pulsdruck und Monozytenadhäsion an Kollagen herstellen (Williams JC 2000).

1.3.2 Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen und Monozyten

Die Adhäsionsmoleküle vermitteln den direkten Kontakt zwischen den Zellen. Dieser Kontakt beruht auf einer Bindung zwischen Liganden und Rezeptoren, den Adhäsionsmolekülen. Sie werden auf der Zelloberfläche exprimiert. Ihre Expression wird durch proinflammatorische Zytokine wie den TNF α (Tumor Necrosis Factor α), das INF γ (Interferon γ), die Interleukine (IL-6 und IL-1), sowie virale und hormonelle Mediatoren stimuliert (Rubio MA 1995). In Abhängigkeit von Funktion und Struktur werden die Adhäsionsmoleküle in 3 Gruppen unterteilt :

1. Selektine – diese dem Lectin ähnlichen Moleküle werden auf der Oberfläche von Endothelzellen (E-Selektin, CD 62E), Leukozyten (L-Selektin, CD 62L) und Thrombozyten (P-Selektin, CD 62P) exprimiert. Funktionell spielen sie in der rolling Phase eine Rolle.
2. Integrine – in dieser Gruppe werden heterodimere Proteine zusammengefasst, die nicht-kovalent an α und β Untereinheiten gebunden sind. Funktionell dienen sie als Liganden während der Adhärenz- und Transmigrationsphase auf der Oberfläche von Leukozyten und Monozyten.
3. Immunglobulin Superfamilie – hierzu werden die Adhäsionsmoleküle ICAM 1-3, VCAM 1, PECAM 1 und MadCAM 1 gerechnet. Lokalisiert sind sie auf Endothelzellen, Monozyten, Leukozyten und Plättchen. Ihre Funktion bezieht sich vornehmlich auf die Transmigrationsphase.

Neben ihrer physiologischen Funktion konnte bei myokardialen und cerebralen Ischämien, Arteriosklerose, rheumatischen und malignen Erkrankungen auch eine pathologischen

Expression der Adhäsionsmoleküle nachweisen werden. Aufgrund ihrer Funktion der direkten Kontaktherstellung sind sie an der Pathogenese der Arteriosklerose unmittelbar beteiligt. Bei den Untersuchungen arteriosklerotischer Läsionen konnte Collins eine erhöhte Exposition von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen nachweisen (Collins T 1993).

Außerdem existieren die Adhäsionsmoleküle nicht nur in einer stationären Phase an Zellmembranen, sondern kommen auch als lösliche Komponente im Serum vor (Littler AJ 1997). Mittels ELISA konnten erhöhte Serumkonzentrationen von sICAM-1 und sVCAM-1 bei Hypertoniepatienten nachgewiesen werden (De Souza CA 1997; Mills PJ 2002). Es wird sogar vermutet, dass mechanische Kräfte im Sinne einer Drucksteigerung bei der Expression von Adhäsionsmolekülen eine größere Rolle spielen als das zirkulierende RAAS (Wang H 2004).

1.4 Tissue Factor

Der Tissue Factor ist eine transmembranäres Phospholipoprotein mit einem Molekulargewicht von 47 kDa. Es wird auf der Oberfläche von zahlreichen Zellen exprimiert und besitzt eine hohe Affinität für die Serin Protease Faktor VII. TF existiert sowohl auf der Zelloberfläche als auch in Form von Mikropartikeln, die von einigen Autoren den Plättchen zugeordnet werden. Der intrazelluläre Anteil ist vorwiegend im Golgi Apparat lokalisiert.

Hohe TF-Konzentrationen wurden in den gut vaskularisierten Organen Lunge, Gehirn, Herz und Plazenta nachgewiesen. Dies spricht für eine physiologisch sinnvolle Verteilung, da eine Blutung in diesen lebenswichtigen Organen fatal wäre (Mackman N 2006). Die Konzentration der physiologisch aktiven Form beträgt beim Gesunden weniger als 20 fM (Butenas S 2005).

Im Ablauf des extrinsischen Gerinnungssystems aktiviert Tissue Faktor den Faktor VII zu Faktor VIIa und bildet mit diesem einen Komplex. Dieser Komplex führt wiederum zu einer Mobilisierung der intrazellulären Komponente mit konsekutiv vermehrter TF-Expression an der Zelloberfläche (Mandal SK 2006). Somit spielt er eine zentrale Rolle in der Hämostase.

Unterschiedliche molekularbiologische, klinische und genetische Studien belegen, dass TF in zahlreiche Pathomechanismen involviert ist. So wurden in letzter Zeit zusätzliche TF abhängige Funktionen entdeckt (Mackman N 2004). Ott konnte unabhängig von der proteolytischen Aktivierung und in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Domäne eine Steigerung von Zellmigrationsprozessen nachweisen. Diese Prozesse werden über die Aktivierung der Proteinkinase p38 und die Interaktion der zytoplasmatischen Domäne mit dem Aktin-bindenden Protein-280 vermittelt (Ott I 1998). Moons postuliert einen

Zusammenhang zwischen Tissue Factor und koronarer Herzkrankheit (Moons AH 2002). Entsprechende Studien von Al-Saady ergaben, dass bei akutem Nierenversagen eine erhöhte Tissue Factor Expression auf Monozyten die Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit beschleunigt (Al-Saady NM 1999). Genetische Variationen des TF Gen sind assoziiert mit einem letalen Verlauf bzw. 3-fach erhöhten Letalitätsrisiko bei akutem Koronarsyndrom (Malarstiq A 2005).

Seine Expression auf Endothelzellen und Monozyten findet unter physiologischen Bedingungen nicht bzw. nur zu einem geringen Ausmaß statt (Osterud B 1998). Im Gegensatz dazu wird im Rahmen von Entzündungen, lokalen vaskulären Schädigungen und insbesondere in rupturierten arteriosklerotischen Plaques die TF-Expression induziert (Houston DS 2002).

Seit längerem wird eine Korrelation zwischen der TF-Expression einerseits und arterieller Hypertonie und Arteriosklerose andererseits angenommen. Untersuchungen von Thiruvikraman ergaben, dass im Bereich arteriosklerotischer Plaques eine erhöhte TF Expression auf endothelialen sowie mononukleären Zellen erfolgt (Thiruvikraman SV 1996). Dechend konnte nachweisen, dass bei Präeklampsie Patientinnen eine erhöhte Expression von Tissue Factor auf humanen Umbilikalvenen Endothelzellen (HUVEC) stattfindet (Dechend R 2000). In der Arbeit von Nagata wird eine Korrelation zwischen der AT1-Rezeptor Aktivität und der TF Synthese von Monozyten vermutet (Nagata K 2001).

Aufgrund dieser Ergebnisse stellt sich die Frage, inwieweit die monozytäre TF-Expression an der Pathogenese von Arteriosklerose und Hypertonie beteiligt ist.

1.5 Nuklearer Faktor κ B

NF κ B ist ein Transkriptionsfaktor. Er bindet spezifisch an NF κ B-Bindungsstellen, die in der Enhancement Region unterschiedlicher Gene lokalisiert sind. Die Aktivierung von NF κ B wird von Zytokinen und Wachstumsfaktoren vermittelt und führt zu einer gesteigerten Expression von inflammatorischen und immunmodulatorischen Genprodukten. Somit spielt aktivierter NF κ B in der Onkologie eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Progression von Tumoren (Inoue J 2007).

Unterschiedliche Studien verweisen auf einen Zusammenhang zwischen aktiviertem NF κ B und Arteriosklerose assoziierten Erkrankungen. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors wird einerseits durch Angiotensin vermittelt (Kranzhofer R 1999), andererseits erfolgt eine Blutdruck getriggerte und vom RAAS unabhängige Aktivierung (Wang H 2004; Riou S

2007). Bereits 1996 konnte Brand bei der Untersuchung humaner arteriosklerotischer Gefäßwände aktivierten NFκB in Endothelzellen, Myozyten und Monozyten nachweisen. Insbesondere die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM1 (intercellular adhesion-molecule1), VCAM1 (vascular cell adhesionmolecule1) und dem Integrin MAC-1 (CD11b/CD18) werden von dem Transkriptionsfaktor reguliert (Brand K 1996). Die Expression von TF wird kombiniert über NFκB und das AP-1 (activator protein 1) gesteuert (Müller J 2006; Ohsawa M 2003). Tierexperimentelle Studien belegen, dass NFκB die inflammatorischen Prozesse im Rahmen der linksventrikulären Hypertrophie hypertensiver Ratten generiert (Takenaka H 2006; Gupta S 2005).

In letzter Zeit werden immer vielfältigere Effekte dieses interessanten Transkriptionsfaktors entdeckt. Im Rahmen einer anschließenden Studie wurde NFκB mittels EMSA in Monozyten von Hypertoniepatienten untersucht.

1.6 Bedeutung des Gerinnungssystems in der Pathogenese der arteriellen Hypertonie

Die Blutgerinnung, auch sekundäre Hämostase genannt, ist ein komplexer, in Phasen ablaufender Vorgang, der durch physiologische und pathophysiologische Prozesse ausgelöst wird und in vivo der Blutstillung dient. Nach der Kaskadentheorie von Macfarlane ist der Ablauf in 3 Phasen gestaffelt (MacFarlane RG 1964). In bezug auf den Aktivierungsmechanismus erfolgt die Unterteilung in einen exogenen (extrinsisches System) und einen endogenen Weg (intrinsisches System). Die Gerinnungsfaktoren I – XIII sind dabei zunächst unterschiedlich beteiligt, um schließlich in einer gemeinsamen Endstrecke die Bildung von Fibrin zu vermitteln.

Vermehrte myokardiale als auch thrombotische Ereignisse im Verlauf einer Hypertonie waren der Anlass für Ursachenforschungen. Mehrere Studien belegen, dass ein Zusammenhang zwischen Blutdruck und Thrombozytenaktivität besteht (Valtier D 1986, Andrioli G 1996).

Vor dem Hintergrund einer erhöhten Tissue Factor Expression auf aktivierten Monozyten vermutet Miller einen Zusammenhang zwischen Hypertonie und einer gesteigerten Gerinnung (Miller MA 1995).

Die arterielle Hypertonie ist eng mit entzündlichen Prozessen assoziiert. Die Kombination aus chronischer Entzündung und mechanischer Belastung führt am Endothel zu einer Konversion der ursprünglich antithrombotischen zu einer prothrombotischen Oberfläche (Dielis AW 2005).

1.7 Therapeutische Aspekte bei essentieller Hypertonie und Arteriosklerose

Im Vordergrund der Behandlung der arterielle Hypertonie stehen zunächst allgemeine Maßnahmen wie die Gewichtsnormalisierung, Nikotin- und Alkoholkarenz und körperliche Aktivität. Leider sind diese Maßnahmen im klinischen Alltag häufig nur unzureichend praktikabel und somit nur bedingt effizient (Schneider CA 2006).

Aus klinischer und pharmakologischer Sicht wird eine am Patienten und seinen Begleiterkrankungen orientierte Therapie empfohlen (Scholze J 1999). Die heutige Basistherapie der arteriellen Hypertonie setzt sich aus einem breiten Spektrum der folgenden pharmakologischen Angriffspunkte zusammen :

- Tonus der Blutgefäße
- Leistung des Herzens
- Urinproduktion der Nieren

Auf metabolischer Ebene wird eine Optimierung des Blutzuckers und Lipidstatus angestrebt. Hinsichtlich des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems wurden in den 80er Jahren Inhibitoren des Angiotensin Converting Enzyms produziert. In den letzten Jahren konnten mit den AT1 Rezeptor Antagonisten moderne, im Vergleich zu den ACE Hemmern nebenwirkungsärmere Medikamente entwickelt werden. Sie unterbinden durch selektive Blockade des AT1 Rezeptors die vasokonstriktorisches aber auch inflammatorische Effekte von AT (Sanz-Rosa D 2005).

In mehreren klinischen Studien konnte belegt werden, dass Statine die Endothelzellfunktion verbessern, antiinflammatorisch und antioxidativ wirken. Zudem stabilisieren sie arteriosklerotische Plaques und hemmen die Proliferation sowie die Aktivierung glatter Muskelzellen (Wierzbicki AS 2003; Arnaud C 2005). Die klinische Bedeutung dieser sogenannten Non-Lipid-Effekte konnte allerdings bis heute nicht geklärt werden.

Zur erweiterten Basistherapie bei Patienten mit gesteigertem kardiovaskulärem Risikoprofil gehören die Thrombozytenaggregationshemmer mit den Nebenwirkungen gastrointestinaler Ulcera und erhöhtem Blutungsrisiko.

In den Focus der kausalen Therapie rückt vermehrt das Immunsystem. Inflammatorische Phänomene wie die Aktivierung von Monozyten, die agonistischen Autoantikörper und die

Expression von Adhäsionsmolekülen spielen eine bedeutende Rolle in der Entwicklung arteriosklerotischer Plaques.

Tierexperimentell konnte nach Gabe von Silica, ein selektives Monozytotoxin die Hypertonie gesenkt und die Hypertrophie des linken Ventrikels inhibiert werden (Bataillard A 1989).

Die chronotropen Effekte des α 1-adrenergen Antikörper bei essentieller Hypertonie konnten nach Applikation von Prazosin antagonisiert werden. Die Entwicklung von Säulenchromatographen ermöglicht die Plasmapherese zur selektiven Elimination der Autoantikörper aus der Blutbahn.

Crutschley konnte nach TF-Inhibition über die Blockade des Kaliumkanals mit Tetraethylammonium Chlorid (TEA) und 4-Aminopyridin (4-AP) eine Reduktion der prokoagulatorischen Aktivität nachweisen (Crutschley DJ 1995). Napoleone konnte in seinen Studien zeigen, dass ACE-Hemmer zu einer Downregulation der TF-Synthese mononukleärer Zellen führen (Napoleone E 2000). Entsprechenden Ergebnissen von Cominacini belegen eine Unterbindung der Adhäsionsmolekülexpression auf endothelialen Zellen nach Zofenopril Stimulation (Cominacini L 2002). Somit beeinflussen die aktuellen Medikamente bereits auf unterschiedlichen Ebenen die beteiligten Komponenten in der Arterogenese. Insbesondere ACE-Hemmer und AT1-Antagonisten sind in der Lage die arteriosklerotischen und prothrombotischen Prozesse im Rahmen der arterielle Hypertonie zu unterbinden.

Inwieweit eine immunsuppressive bzw. antiinflammatorische Therapie die arterielle Hypertonie beeinflusst ist bisher nicht erforscht und bleibt zukünftigen Studie vorbehalten.

2. Herleitung der Aufgabenstellung

Die arterielle Hypertonie gehört zu den führenden Risikofaktoren für die Entwicklung einer Arteriosklerose (Violi F 1996). In den Industrienationen ist sie der bedeutendste Risikofaktor für arteriosklerotische Gefäßwandläsionen. Die Mechanismen zwischen erhöhtem Blutdruck und Ausbildung von arteriosklerotischen Plaques sind jedoch nicht vollständig aufgeklärt. Ziel der hier dargelegten Untersuchung ist es, molekulare Mechanismen in Monozyten zu identifizieren, die zum Verständnis der Pathophysiologie der Hypertonie beitragen.

Als gemeinsame Grundlage der beiden Krankheitsentitäten werden morphologische und funktionelle Alterationen des Endothels und des Immunsystems angenommen. Entgegen der allgemein akzeptierten Vorstellung, dass vorrangig endotheliale Zellen für die Aktivierung von Monozyten verantwortlich sind, gehen wir von einer druckbedingten Aktivierung der Monozyten aus. Die anschließende subendotheliale Infiltration und Entwicklung arteriosklerotischer Plaques führen wir auf diese Aktivierung zurück.

Arteriosklerotische Veränderungen verlaufen auf dem Boden einer chronischen inflammatorischen Reaktion. Eine Komponente dieser Entzündungsreaktion sind periphere Monozyten. Aufgrund ihrer morphologischen Variabilität war die Isolierung dieser Zellen bisher schwierig und mit deutlichen Einschränkungen verbunden. Die erste Frage lautete somit : Ist ein schonendes, sensitives und spezifisches Isolierungsverfahren verfügbar und sein Einsatz praktikabel ?

Mehrere Studien belegen, dass Monozyten von Hypertonikern aktiviert sind und eine verstärkte Adhäsion an humane Endothelzellen aufweisen. Als Zeichen der Aktivierung produzieren sie vermehrt proinflammatorische Zytokine und Superoxid (Clozel M 1991; Dörffel Y 2001). Weiterhin wird vermutet, dass Hypertoniepatienten für thrombotische Ereignisse prädestiniert sind (Miller MA 1995).

Im Hinblick auf die gesteigerte Adhäsion stellte sich die Frage, ob aktivierte Monozyten ihr Expressionsverhalten ändern und intensiver Adhäsionsmoleküle exprimieren. Aufgrund der Vermutung einer hypertonieassoziierten Alteration der Hämostase wurde in dieser Arbeit die Hypothese untersucht, ob Monozyten von Hypertoniepatienten eine gesteigerte TF-Expression aufweisen.

Im Rahmen des Antiphospholipid Syndroms exprimieren Monozyten nach Antikörperstimulation TF (Wolberg AS 2004). Seit längerer Zeit wurden solche Antikörpern auch bei

der arteriellen Hypertonie nachgewiesen. Fu und Liao entdeckten in Seren von Patienten mit maligner und benigner arterieller Hypertonie agonistische Autoantikörper, die gegen den AT1 Rezeptor gerichtet sind (Fu ML 2000; Liao YH 2002).

Im Rahmen der Präeklampsie, einer besonders foudroyanten Verlaufsform der arteriellen Hypertonie bei schwangeren Frauen, kommt es zur Minderdurchblutung bis hin zur Infarzierung der Plazenta. Das pathomorphologische Korrelat sind akute arteriosklerotische Gefäßwandläsionen der Basilararterien. In den Seren von Präeklampsie Patientinnen wurde der AT1-AK nachgewiesen. Die Studien von Dechend dokumentieren die Charakterisierung des Epitops und die Aktivierung des AT1 Rezeptors. Interessanterweise induziert dieser AT1-AK eine gesteigerte TF-Expression auf glatten Gefäßmuskelzellen (Dechend R 2006).

Weiterhin ist bekannt, dass der AT1-AK den AT1 Rezeptor auf humanen Trophoblasten aktiviert und konsekutiv deren Expression von Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI-1) induziert (Xia Y 2003).

Diese Daten belegen die Relevanz des AT1-AK in der Pathogenese der arteriellen Hypertonie und Arteriosklerose. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese untersucht, ob der AT1-AK das Expressionsmuster von Monozyten beeinflusst.

3. Methodik

3.1 Monozytenisolation

3.1.1 Blutentnahme

Die Spritzen wurden zunächst mit 20 ml Natriumchlorid 0.9 % und Heparin 2000 IE vorbereitet, um die Gerinnung zu verhindern. Nach zweimaliger Desinfektion der Punktionsstelle wurde am sitzenden oder liegenden Patienten aus der Vena mediana cubiti 30 ml Blut pro Spritze entnommen. Die Volumina beliefen sich dabei insgesamt auf 50 –100 ml.

3.1.2 Frischblutaufarbeitung

Zur Trennung der verschiedenen Blutbestandteile wurde vor Zentrifugation ein geschichteter Gradient erzeugt. Dabei wurden 35 ml Blut über 15 ml Ficoll geschichtet (Abb. 3). Ficoll ist eine nicht ionische Dichtegradientenlösung mit einer Dichte von $1,090 \text{ g/cm}^3$ und einer Viskosität von 37 Ns/m^2 . Die Zentrifugation erfolgte bei 20°C , $160g$ und ohne Bremse zur Wahrung des Gradienten über 20 min. Anschließend wurde der Überstand verworfen und somit die Plättchenkontamination minimiert. Es folgte ein zweiter Zentrifugationsschritt bei $350g$ für 20 min (Dyna-Bead Protokoll, Dörffel Y 1999).

Abb.3

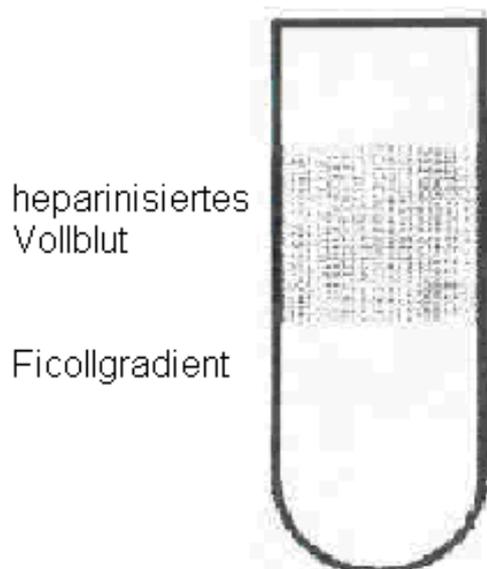
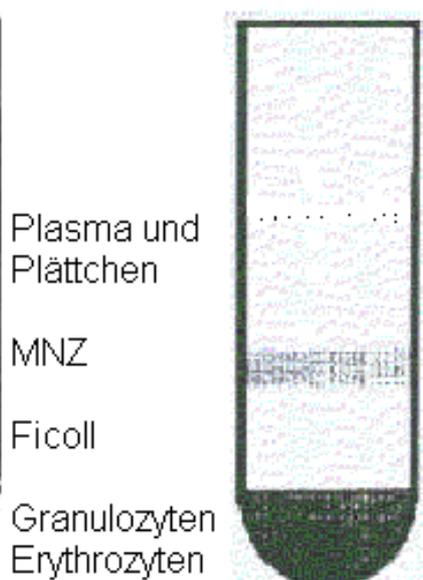


Abb.4



Die mononukleären Zellen (MNZ) befinden sich in der Interphase (Abb.4). Diese wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt. Die gewonnenen Zellen wurden mit einer Waschlösung bestehend aus PBS (phosphat buffered Saline) und 5% BSA (bovine serum albumin) in 3 Zentrifugationsschritten gereinigt.

3.1.3 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Die Zellsuspension wurde resuspendiert und ein Volumen von 10 µl in eine Zählkammer überführt. Nach der Methode von Neubauer wurden die mononukleären Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte mittels folgender Formel:

Mittelwert der 4 Quadranten x Zählkammer Faktor 10^4 x Volumen der Zellsuspension

Zur Vitalitätskontrolle der Zellen erfolgte deren Anfärbung mit Trypanblau. Dazu wurden 5 µl Zellsuspension mit 5 µl Trypanblau-Lösung resuspendiert. So färbten sich die Zellen mit Membrandefekt blau an und waren dementsprechend avital. Ihre Anzahl wurde ausgezählt und prozentual ermittelt.

3.1.4 Das negativ Isolierungsverfahren

Monozyten wurden mit dem negativ Isolierungsverfahren gewonnen. Hierbei wurde der Monocyte negative isolation kit der Firma Dynal A.S. Oslo/Norwegen verwendet, bestehend aus Dynabeads, Antikörperlösung und Blockreagenz (antibody mix und blocking reagent).

Dynabeads sind gleichförmige, paramagnetische Partikel. Sie sind mit dem humanen Immunglobulin IgG4 beschichtet, das gegen das IgG Fab-Fragment von der Maus gerichtet ist.

Die Antikörperlösung besteht aus monoklonalen Antikörpern von der Maus, die gegen die Oberflächenmarker menschlicher B- und T-Lymphozyten sowie NK-Zellen und Granulozyten gerichtet ist (CD2,CD7,CD16a&b,CD19 und CD56).

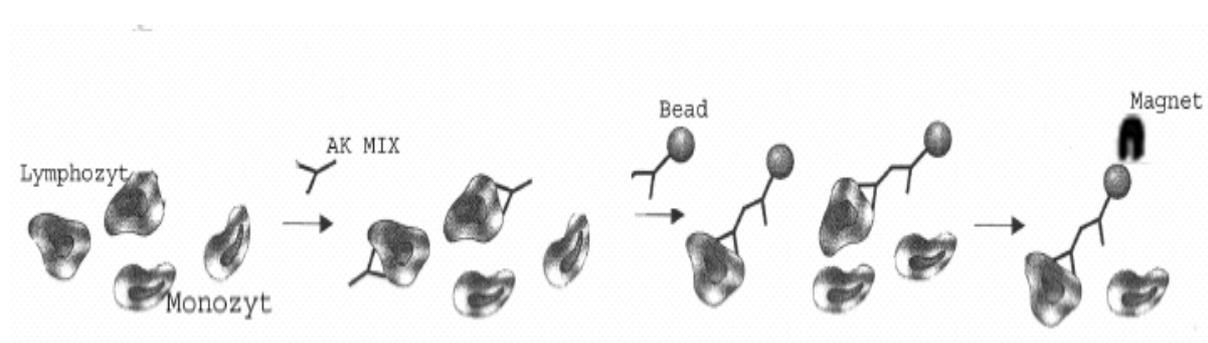
Das Blockreagenz enthält ein Gammaglobulin, das an die FcR Fragmente von Monozyten bindet und somit deren Markierung unterbindet.

3.1.5 Prinzip

Die Dynabeads wurden zunächst mit PBS und 0.1% BSA gewaschen. Die in 3.1.2 gewonnenen mononukleären Zellen wurden durch Zugabe von Blockreagenz im Bereich ihres FcR Fragments maskiert und somit einer möglichen Antikörpermarkierung entzogen. Anschließend erfolgte durch Zugabe von antibody mix die selektive Markierung der unerwünschten Zellen (B-,T-Lymphozyten, NK Zellen). Nach einer Inkubation von 10 min bei 2-8°C wurde die Zellsuspension mit PBS/0.1%BSA gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe der Dynabeads. Die anschließende Inkubation fand unter rotierenden Bedingungen bei 2-8°C statt. Somit wurde versucht, optimalere Kontaktbedingungen zwischen Dynabeads und mononukleären Zellen zu schaffen. In dieser Phase bildeten sich rosettenförmige Partikel, bestehend aus den Dynabeads und antikörpermarkierten Zellen. Diese Suspension wurde vorsichtig resuspendiert und anschließend langsam das Volumen unter Zugabe von 1-2ml PBS/0.1%BSA pro 10^7 Zellen erhöht.

Im letzten Schritt wurde die Zellsuspension auf einer Magnet-Trennsäule platziert. Die magnetisch markierten Zellen wurden an der Säule zurückgehalten. Der Überstand enthält die unmarkierten Monozyten und wurde mit einer Pipette in ein neues Gefäß überführt.

Abb.5 Inkubation mit dem Primärantikörper



Inkubation mit dem Dynabead gekoppelten Sekundärantikörper und anschließende Separation mittels der Magnet-Trennsäule (MPC).

3.1.6 Monozytenreinheit

Zur Überprüfung der Reinheit der gewonnenen Zellen wurden FACS-Analysen durchgeführt. Das Durchflusszytometer charakterisiert Zellen anhand von Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften. Dabei werden die Zellen durch den Strahlengang eines Lasers mit bestimmter Wellenlänge geschickt. Die Interaktion zwischen Laserstrahl und Zelle wird als Lichtbeugung und -streuung registriert. Beide geben Aufschluss über die Größe und Granularität. Die zusätzliche Markierung spezifischer Oberflächenmoleküle mit fluoreszierenden Antikörpern ermöglicht eine genaue Charakterisierung der jeweiligen Zellpopulation.

Die Monozyten wurden zunächst mit Antikörpern gegen monozytenspezifische Oberflächenmoleküle inkubiert. Es wurden folgende Antikörper verwendet :

- Allophycocyanin markierter Maus-Antikörper gegen CD14
- Fluoreszine Isothiozyanat markierte Antikörper gegen CD11a, CD54, CD49d, CD29
- Phyerytrine markierte Antikörper gegen CD11b, CD31, CD44, CD62L
- Isotyp-Kontroll-Antikörper (monoklonaler Maus IgG1 und IgG2 Antikörper)

Im Anschluss erfolgten Waschschrte und die Fixierung in 300 µl 1% Paraformaldehyd.

Die Monozyten ergaben im FSC- und SSC-Bild ein typisches Fluoreszenzmuster und konnten von möglichen anderen Leukozytenpopulationen differenziert und ausgewertet werden.

Eine weitere Differenzierung der Zellpopulationen erfolgte mittels spezifisch fluoreszierender Antikörper gegen CD 14 (Monozyten), CD 3 (Lymphozyten) und CD 19 (B-Lymphozyten). Im APC-Floureszenz-Histogramm konnten die gezielt die CD 14 positiven Ereignisse ausgewertet werden.

3.2 Stimulation peripherer Monozyten

Die in 3.2 gewonnenen Monozyten wurden in einem Verhältnis von 1 Million Zellen pro ml Nährmedium RPMI 1640 inkubiert. Zu dem Nährmedium wurde Glutamin (2mM), Penicillin (100U/ml) und Streptomycin (0,1%) zugegeben, um optimale Kulturbedingungen zu gewährleisten. Danach erfolgte die Zugabe von gereinigtem AT1-AK im Verhältnis 1:100. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank unter physiologischen Bedingungen (37°C, 5% CO²) über 12h inkubiert. Als Inkubationsgefäße wurden Polypropylenläser verwendet, um einer adhäsionsvermittelten Aktivierung der Monozyten vorzubeugen. Die Stimulationszeit, Temperatur und Konzentration der Substrate stimmen mit den Literaturdaten überein (Dörffel Y 2003; Hahn AW 1994; Dechend R 2000).

3.3 Probenaufbereitung

Nach der Isolierung und Stimulation wurden die Monozyten mit PBS/0.1%BSA gewaschen und in ein Eppendorf Gefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 15 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und das Pellet sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zur Weiterverarbeitung wurde das Pellet in Probenpuffer aufgenommen. Dabei handelt es sich um eine Lösung, die der Lysierung der Zellmembranen dient, um somit ein möglichst homogenes Proteingemisch zu erhalten. Zusätzlich erhalten die Proteine aufgrund des alkalischen pH-Wertes eine negative Partialladung. Zur Denaturierung wurde das Homogenat bei 95°C erhitzt.

Probenpuffer :	SDS	2% (w/v)
	Phosphorsäure	50 mM
	EDTA	5 mM
	Glycerin	10% (w/v)
	Bromphenolblau	0.005% *

Zur Einstellung des pH-Wertes wurde festes TRIS verwendet.

* Zugabe von Bromphenolblau erfolgte erst nach der Proteinbestimmung, da die Substanz Störungen der photometrischen Messung hervorrufen würde.

3.3.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der Proben wurde anhand der Methode nach Lowry und Mitarbeitern durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine Standardmethode, die die Oxidierbarkeit aromatischer Aminosäuren ausnutzt. Dies hat eine gewisse Störanfälligkeit zur Folge, die durch Mitführen eines Kontroll-(Blank-)wertes berücksichtigt wurde. Da die Reaktionsbedingungen einer Schwankungsbreite unterworfen sind, wurde bei jeder Analyse eine Standardproteinreihe im Bereich von 0-100 µg gemessen. Die verwendete Bezugslösung bestand aus 5.0 mg/ml BSA mit 0.1 SDS (w/v).

- Lösungen :
- A 20 g Na₂CO₃ in 1000 ml 0.1 N NaOH
 - B 1g CuSO₄ x 2H₂O in 100 ml Aqua dest.
 - C 2g Na-K-Tartrat in 100 ml Aqua dest.
 - D Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz
Stammlsg. 1:1 mit Aqua dest.
 - E 1 Vol. B und 1 Vol. C mischen, dann 50 Vol. A zugeben

Die Ansätze wurden in Triplikaten angefertigt und bei einer Wellenlänge von 585nm photometrisch bestimmt. Grundlage dieser photometrischen Proteinbestimmung ist das Lambert-Beersche Gesetz : $E_{\lambda} = \log_{10} I_0/I = \epsilon_{\lambda} \times c \times d$.

E_{λ} : Extinktion bei der Wellenlänge λ

I_0 : Intensität des einstrahlenden Lichtes

I : Intensität des verlassenden Lichtes

C : Konzentration

D : Schichtdicke der durchleuchteten Lösung

Nach Messung der Absorption der Probe (A) und des Blank (B) erhält man :

$$\mu\text{g Protein}/100 \mu\text{l} = A - B$$

3.4 Hypertoniepatienten- und Kontrollgruppe

3.4.1 Auswahlkriterien der Studienteilnehmer

An der Studie zur Messung der Tissue Factor Expression auf Monozyten nahmen 20 Männer und 20 Frauen (mittleres Alter 60,5 Jahre) teil. Jeder Teilnehmer wurde über die Studie aufgeklärt. Die Einverständniserklärung erfolgte von allen Probanden in schriftlicher Form. Seitens der Ethik Kommission der Charite lag ein positives Votum vor. Die Kontrollgruppe setzte sich aus bezüglich Alter und Geschlecht vergleichbaren, normotensiven Probanden zusammen.

3.4.2 Hypertoniepatienten

Hypertoniepatienten wurden überwiegend aus der Medizinischen Poliklinik der Charite und teilweise aus den internistischen Abteilungen ausgewählt. Die Patienten befanden sich primär in Behandlung bezüglich der essentiellen Hypertonie, sekundäre Hypertonieformen wurden im Vorfeld ausgeschlossen. Die Einschlusskriterien beinhalteten erhöhte systolische (150 – 220mmHg) und diastolische (95-120mmHg) Blutdruckwerte. Die antihypertensive Medikation wurde für mindestens 72 h unterbrochen. Weiterhin wurde sonografisch eine höhergradige Arteriosklerose der Karotisarterien ausgeschlossen.

Als weitere Ausschlusskriterien galten Laborwerte außerhalb des Normbereichs für Natrium, Kalium, Kreatinin, Leberenzyme (ASAT/ALAT), CRP (C-reaktives Protein), Cholesterin, Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten. Anamnestisch wurden chronisch entzündliche Erkrankungen, Diabetes mellitus, Malignome und Zustand nach aktueller OP ausgeschlossen.

3.4.3 Normotensive Probanden

Als Kontrollgruppe fungierten Mitarbeiter des MDC und der Charite. Einschlusskriterium war eine normotensive Blutdrucksregulationslage. Ausgeschlossen wurden Raucher, Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen, Diabetes mellitus, Hyperlipoproteinämie oder Malignomen.

Tabelle 2 : Laborparameter der Studienteilnehmer

Parameter	Hypertoniker Mittelwerte (min.-max.)	Referenzbereich
Natrium	138.4 mmol/l (134 – 146 mmol/l)	135 – 153 mmol/l
Kalium	4.36 mmol/l (3.7 – 4.5 mmol/l)	4.2 mmol/l 3.6 – 5 mmol/l
Kreatinin	0.94mg/dl (0.6 – 1.1 mg/dl)	<0.5 – 1.1 mg/dl
ALAT	18.4 U/l (15 – 24 U/l)	bis19 (w) bzw. 23 (m) U/l
ASAT	13.8 U/l (9 – 15 U/l)	bis 15 (w) bzw. 19 (m)
Glucose	98 mg/dl (67 – 110 mg/dl)	< 70 – 109 mg/dl
Cholesterol	195 mg/dl (137 – 220 mg/dl)	< 250 mg/dl
LDL	130 mg/dl (103-147 mg/dl)	< 160 mg/dl
Hämatokrit	47 % (39 – 48 %)	40-52%(m), 37-48%(w)
Leukozyten	5200/ μ l (4100 – 8700 μ l)	3800 – 10500 / μ l
Thrombozyten	260 000/ μ l (187 000-346 000/ μ l)	140 000 – 345 000 / μ l

Tabelle 3 : Auswahlkriterien für die Tissue Factor Bestimmung

Parameter	Hypertoniker Mittelwerte (min.-max.)	Normalkontrollen Mittelwerte (min.-max.)
Alter	62 Jahre (38 – 81 Jahre)	59 Jahre (34 – 85 Jahre)
systolischer Blutdruck	164 mmHg (120 – 210mmHg)	122 mmHg (110 – 140 mmHg)
diastolischer Blutdruck	99 mmHg (80 – 120mmHg)	74 mmHg (50 – 90 mmHg)
Körpergewicht	82 kg (66 – 94 kg)	76 kg (58 – 87 kg)
Body mass index	26 kg/m ² (20.7 – 28 kg/m ²)	24 kg/m ² (23 – 26.1 kg/m ²)

3.5 Nachweis von Tissue Factor und ICAM1 mittels Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren zum spezifischen Nachweis von Proteinen. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf eine Membran erfolgt die spezifische Detektion des Proteins mittels Antigen-Antikörperreaktion. Fluoreszierende sekundäre Antikörper ermöglichen die radiographische Darstellung auf einem Röntgenfilm.

3.5.1 Elektrophorese

Das analytische Verfahren zur Auftrennung der Proteine ist die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE). Hierbei handelt es sich um ein Trennverfahren, in dem geladene, hydrophobe Partikel einem elektrischen Feld ausgesetzt und durch eine Matrix aus hydrophilen, synthetischen Polymeren getrieben werden.

Die negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Ihre Beweglichkeit ist dabei annähernd ihrem Molekulargewicht proportional. Nach Erreichen des isoelektrischen Punktes kommen die Proteine zum Stillstand und akkumulieren. Sie sind während dieses Vorganges von den Ionen eines Puffersystems (Elektrodenpuffer) umgeben. Die Laufgeschwindigkeit wird von der angelegten Spannung vorgegeben (Holtzhauer M 1995).

3.5.2 Elektrophorese-System

Die Apparatur besteht aus einer Kammer mit integriertem Rahmen. Dieser Rahmen umfasst das zwischen zwei Glasplatten fixierte Gel. An seiner Oberseite verläuft ein Platindraht, worüber der Kontakt zur Spannungsquelle hergestellt wird. Die Kammer wird mit Elektrodenpuffer aufgefüllt und anschließend mit einem Deckel fest verschlossen. Die Elektroden werden mit einer Stromquelle verbunden, über die die Spannung und die Stromstärke reguliert werden können.

3.5.3 Elektrophorese-Gel

Bei dieser Arbeit wurde das SDS-PAGE System nach LAEMMLI verwendet (Laemmli UK 1970). Das Gel besteht aus zwei Komponenten. Im Sammelgel befinden sich Taschen zur Aufnahme der Proben. Das Trenngel dient der Auftrennung der Proteine.

Nach dem jeweiligen Molekulargewicht der Proteine richtet sich die Zusammensetzung des Elektrophoresegels. Da die Oberflächenmoleküle ICAM-1 und Tissue Factor ein unterschiedliches Molekulargewicht besitzen, wurden verschiedene Acrylamid-Konzentrationen verwendet. Acrylamid dient der Polymerisation und bestimmt die Gitterstruktur des Geles.

Initial erfolgten Untersuchungen hinsichtlich der Spezifität, Konzentration und möglicher Kreuzreaktionen der Primär- und Sekundärantikörper. Es wurde zunächst zwei polyklonale Antikörper der Firma LOXO GmbH Dossenheim (Goat anti human TF, Rabbit anti human TF) untersucht. Die Versuche ergaben jedoch eine geringe Spezifität und ausgeprägte Kreuzreaktionen bzgl. der verwendeten Sekundärantikörper.

Anti human TF-AK VIC7 wurde in unterschiedlichen Konzentration zum Nachweis von rekombinatem humanem Tissue Factor und maternalem Plazentagewebe von Präeklampsie Patientinnen getestet. Analog wurde der anti ICAM1-Antikörper an genmanipulierten HUVEC mit einer Überexpression von ICAM1 und rekombinatem humanen ICAM1 untersucht. Die Versuche wurden sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt.

Die Sekundärantikörper (POD-Conjugated Goat Anti-Mouse AK und POD-Conjugated Rabbit Anti-Mouse AK) wurden auf mögliche Kreuzreaktionen getestet. Humane Monozyten wurden dabei nur mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert.

3.5.4 Versuchsaufbau und Ablauf

Die Glasplatten und Abstandshalter wurden desinfiziert und in eine Haltevorrichtung eingespannt, so dass sich ein Spaltraum von 1mm Breite ergab. Der Unterrand wurde mit einem Gummistreifen abgedichtet. Darauf wurde der Spaltraum bis zu 80% mit der Trenngellösung vorsichtig aufgefüllt und mit Wasser überschichtet. Das Trenngel polymerisierte über 2 Stunden. Anschließend wurde das Wasser mittels Filtern entfernt und das Sammelgel überschichtet, in dem ein Taschenkamm eingespannt wurde. Nach Polymerisierung des Sammelgels wurde die Kammer mit Elektrodenpuffer aufgefüllt und die Taschen gespült. Mit einer Feinnadelpipette wurden die Taschen mit den Proben beimpft, wobei pro Bahn 10µg Protein aufgetragen wurde. Die Proben enthalten Bromphenolblau (0.005%). Somit sind die Proteine als Elektrophoresefront während der vertikalen Wanderung durch das Gel sichtbar. Die Außenbahn wurde mit einem Farbmarker (low range, BIO-RAD) versehen, der im Bereich von 20.5 kDa bis 113 kDa als Orientierungshilfe diente.

Als Referenz für Tissue Factor wurde Plazentagewebe von Präeklampsiepatientinnen, für das Adhäsionsmolekül ICAM-1 gentechnisch manipulierte HUVECs mit Überexpression von ICAM-1 verwendet. Nach einer Einlaufzeit von 15 Minuten bei 80 V erfolgte die Auftrennung bei 100 V über 1.5-2 h. Um Wärmestau (Coulombsche Wärme) im Elektrophoresegel zu vermeiden, wurde die Kammer mit Eis gekühlt.

3.5.5 Konzentrationen der Elektrophorese-Substanzen

<u>Trenngel 12 %</u>		<u>Trenngel 15%</u>	
(ICAM-1)		(TF)	
Aqua dest.	6.6	Aqua dest.	4.6
30 % Acrylamid	8.0	30 % Acrylamid	10.0
1.5M TRIS (pH 8.8)	5.0	1.5M TRIS (pH 8.8)	5.0
10 % SDS	0.2	10 % SDS	0.2
10 % APS	0.2	10 % APS	0.2
TEMED	0.008	TEMED	0.008
 <u>Sammelgel</u>		 <u>Elektrodenpuffer</u>	
Aqua dest.	4.1	Glycin	192 mM
30 % Acrylamid	1.0	TRIS	25 mM
1.0 M TRIS (pH 6.8)	0.75	SDS	0.1 %
10 % SDS	0.06		
10 % ADS	0.06	PH Wert 8.3, mit Aqua dest. auf 1 l	
TEMED	0.006	auffüllen	

Alle Substanzen wurden mit Spatel, Löffel und elektrischer Pipette aufgenommen, auf der Feinwaage sorgfältig abgewogen und unter rotierenden Bedingungen aufgelöst. Die Verwendung toxischer Substanzen erfolgte unter dem Abzug und im Rahmen der örtlichen Sicherheitsbestimmungen.

3.5.6 Wet Blot

Die Überführung elektrophoretisch getrennter Proteinspezies von der Gelmatrix auf eine proteinbindende Oberfläche wird Blotting genannt und ermöglicht eine bessere Zugänglichkeit für die anschließende Antigen-Antikörperreaktion.

3.5.7 Versuchsaufbau und Ablauf

Bei dem Wet Blot Verfahren wandern die Proteine in horizontaler Richtung aus dem Gel in die Membran. Als proteinbindendes Material wurde eine Nitrocellulosemembran verwendet. Dabei werden Gel und Membran nach dem Sandwichprinzip aufeinander fixiert und in eine Elektrophoresekammer eingespannt. Diese wird mit Transferpuffer aufgefüllt und an eine Spannungsquelle angeschlossen. Die Stromstärke für den Transfer berechnete sich nach der Formel :

Breite x Länge des Gels (cm) x Faktor 0.8 = Stromstärke I (mA)

Dabei steigt die angelegte Spannung nicht über 15 V.

Transferpuffer

TRIS	0.025mM
Glycin	0.306 M
SDS	0.01 % (w/v)
Methanol	20 % (v/v)

Mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen.

3.6 Immunochemischer Antigennachweis

Der immunochemische Nachweis des Antigens erfolgte in 2 Schritten :

1. Detektion des Antigens mittels spezifischem Primärantikörper
2. Markierung des Primärantikörpers mit dem Sekundärantikörper

3.6.1 Inkubation mit primärem und sekundärem Antikörper

Nach Elektrotransfer wurde die Membran zunächst mit Pouceaut-Rot angefärbt, um eine Markierung der Bahnen sowie der Markerbanden zu ermöglichen. Entfärbt wurde mit Aqua dest. Zur Blockade der freien, unspezifischen Bindungsstellen wurde die Membran 3x über 5 min bei Raumtemperatur in einer Blocklösung gebadet. Das Volumen stand im Verhältnis zu der Membranfläche und betrug 1 ml/cm^2 . Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper. Zur Detektion von Tissue Factor wurde der Antikörper VIC7 (Hybridomüberstand anti human TF von der Maus, Klon VIC7, Albrecht S 1992/96) in einer Verdünnung von 1:5 eingesetzt. Der Nachweis von ICAM-1 erfolgte mittels anti-human ICAM-1 Antikörper (mouse monoklonal IgG_{2a} antibody, Santa Cruz) in einer Verdünnung von 1:1000. Zur Verdünnung wurde TBST-Lösung verwendet. Die Inkubation erfolgte in der dem Titer der Antikörperlösung entsprechenden Verdünnung in einem Volumen von ca. $0,2 \text{ ml/cm}^2$ bei 5°C unter rotierenden Bedingungen. Die Inkubationszeit betrug 12 h.

Im 2. Schritt wurde die Membran 6x über 1.5 min in einem Waschpuffer gewaschen. Der peroxidasegekoppelte Sekundärantikörper (horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin, Firma DAKO) wurde im Verhältnis 1:5000 mit TBST vermischt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur unter rotierenden Bedingungen über 2 h.

3.6.2 Konzentrationen der Inkubationssubstanzen

TS Lösung (10-fach konzentriert)		Block Puffer	
TRIS 500 mM	6.06 g	TRIS	2 ml
(mit HCl 1n auf pH 7.5 eingestellt)		NaCl	2 ml
NaCl 1.5 M	8.77 g	Triton x-100	2 ml
Triton x-100 2%	2 ml	BSA	0.4 g
		Aqua bidest.	14 ml

Waschpuffer

TRIS	20 ml
NaCl	20 ml
Triton x-100	20 ml
BSA	1 g
Aqua bidest	140 ml

Färbelösung

Pouceaut Rot	1 ml
Aqua dest	1 ml

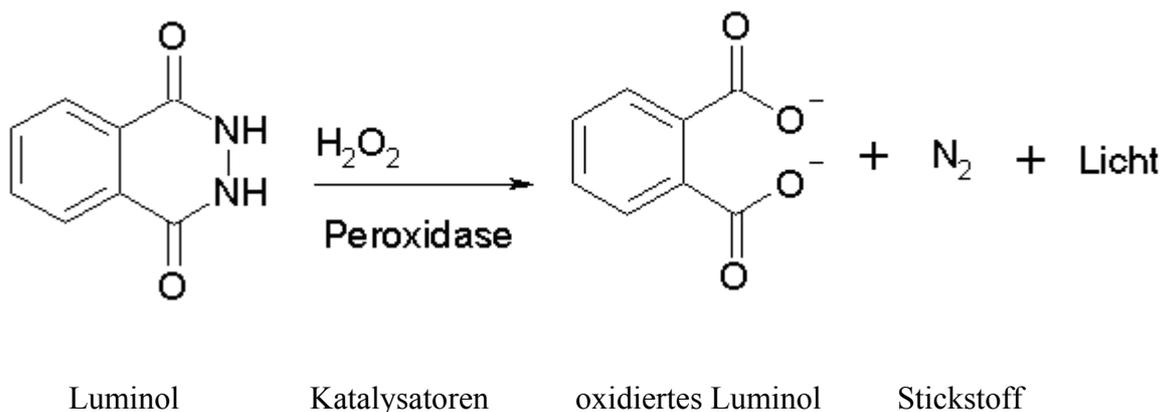
Die Einstellung des pH-Wertes erfolgt mittels einer pH-Elektrode, die nach wiederholter Eichung sowie anschließender Reinigung den angestrebten pH-Wert ermittelt.

3.7 Radiographischer Nachweis der Banden

3.7.1 Chemilumineszenz-Prinzip

Zum Nachweis der detektierten Proteine wurde ein auf Chemilumineszenz basierendes Verfahren angewendet. Dieses Verfahren beruht auf der Freisetzung von Licht im Rahmen einer enzymatischen Reaktion. Die Peroxidase des Sekundärantikörpers fungiert dabei als Katalysator der chemischen Reaktion. Hierbei wird die Substanz Luminol mittels der Peroxidase und H_2O_2 oxidiert und somit auf ein höheres Energieniveau angehoben. Beim Übergang in den ursprünglichen Energiezustand wird Energie in Form von Licht freigesetzt. Zur Chemilumineszenz wurde der ECL-Kit (enhanced chemiluminescence) verwendet, der durch zusätzliche, als Verstärker fungierende Chemikalien (z.B. Phenol) eine annähernd 1000fach erhöhte Lichtemission ermöglicht.

Abb. 7 :



3.7.2 Radiographische Methode

Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran 6x jeweils 1,5 min mit Waschpuffer gewaschen. Die folgenden Schritte fanden in der Dunkelkammer statt:

Die lichtempfindlichen Detektionslösungen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Diese Lösung wurde gleichmäßig über die Membran verteilt und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran in Klarsichtfolie überführt und mögliche Luftblasen durch Ausrollen mit einem Glasstab entfernt. Anschließend wurde die Membran in eine Filmkassette gelegt, wobei die Seite auf der sich die Proteine befinden die Oberfläche bildete. Darauf wurde ein Röntgenfilm platziert und die Kassette verschlossen. Anhand wiederholter Testung wurde zunächst der Röntgenfilm mit der optimalen Empfindlichkeit eruiert. Weiterhin erfolgte die Untersuchung hinsichtlich der Expositionszeit zwischen 0,25 und 5 Minuten. Bezüglich der Oberflächenmolekülbestimmung wurde eine Zeit von 5 Minuten determiniert.

Die Entwicklung des Films erfolgte maschinell.

4. Ergebnisse

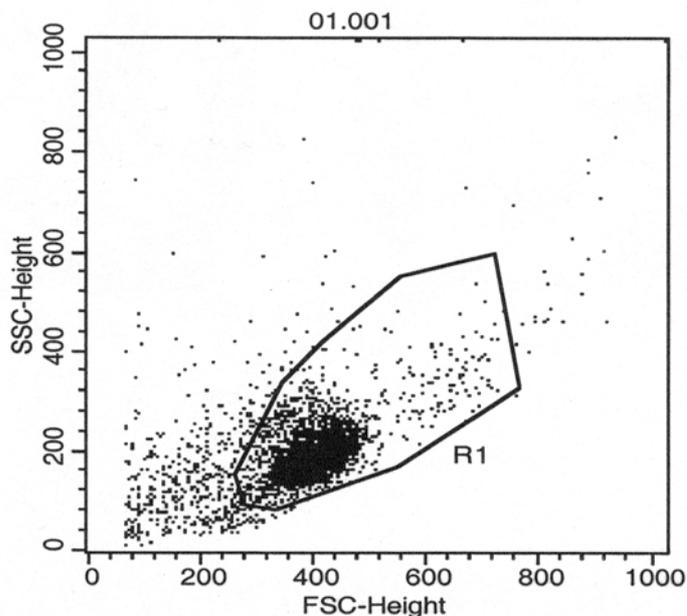
4.1 Evaluation der Methoden

4.1.1 Analyse der Monozytenisolation

Anhand von flußzytometrischen Untersuchungen wurde der Reinheitsgehalt an Monozyten bestimmt. 15-50% der MNZ sind in Abhängigkeit vom Spenderblut Monozyten. Die isolierten Monozyten sind zu ca. 98% lebend und frei von gebundenen Antikörpern oder Dynabeads. Die Reinheit ist größer als 90 %, wobei CD2, CD7, CD16, CD19 und CD56 positive Zellen zu mindestens 98 % entfernt sind.

Die Monozyten wurden nach typischem Größen Fluoreszenzmuster durch forward- versus side-scatter Parameter (R1) erkannt und ausgewertet (Abb.8).

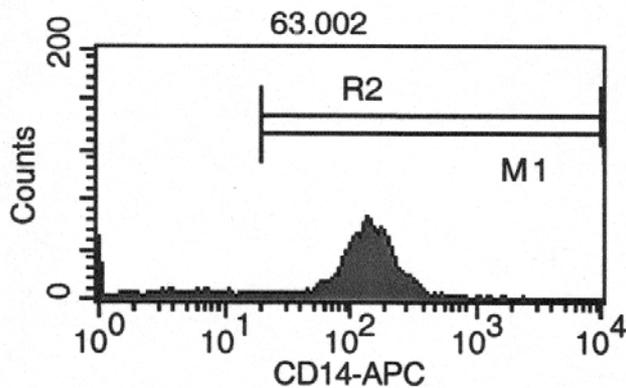
Abb.8



Monozytendifferenzierung im Dot-Plot FSC-SSC-Bild durch Wahl von R1

Zusätzlich werden nur CD14 positive Ereignisse (R2) im APC-Fluoreszenz-Histogramm als Monozyten gewertet (Abb.6). Es wurden mindestens 10.000 Ereignisse gemessen.

Abb.9



Monozytendifferenzierung im CD14-APC-Histogramm durch Wahl von R2

Nach Ficoll Zentrifugation sind 95 % aller Zellen mononukleäre Zellen, ca. 50±10% der Lymphozyten des Vollblutes bleiben erhalten. Verunreinigend sind ca. 3 % Granulozyten und bis zu 5 % Erythrozyten. Nach Dynabead Isolierung sinkt die Zellzahl durch Entfernung des Lymphozytenanteils auf 10- 20 % der Zellen nach Ficoll Isolation. Aus 120 ml Blut erhalten wir durchschnittlich zwischen 10 –30 Millionen Monozyten.

4.1.2 Vitalität

Zur Kontrolle der Toxizität der Isolierung erfolgte eine Färbung der Proben mit Trypanblau und Propidium Iodid (PI). Ca. 95% aller Zellen überleben. Tote Zellen nach PI Färbung sind im FACS in FL1 und FL2 positiv. Über die Auswahl des Gates ist die ausschließliche Messung der lebenden Zellen möglich.

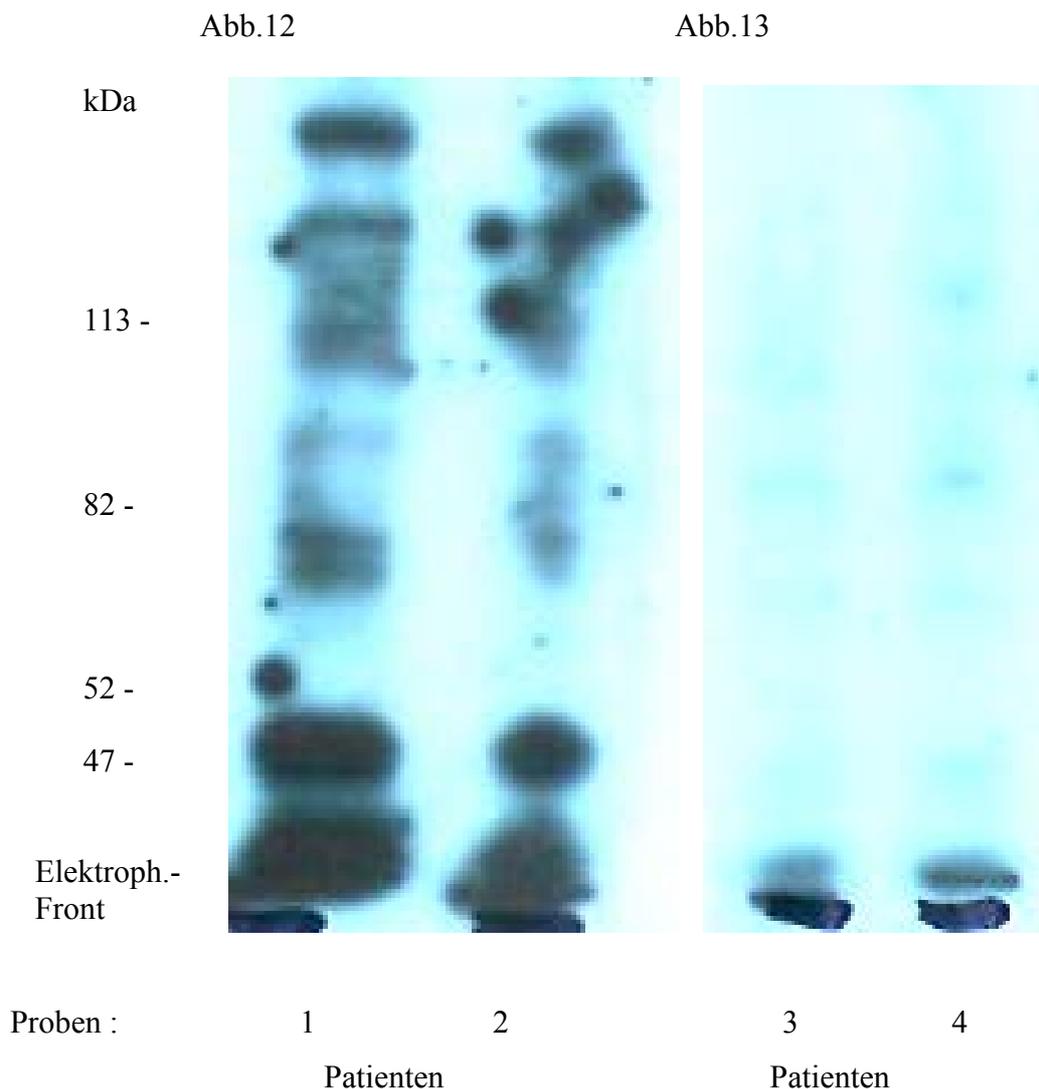
4.1.3 Reinheit

Zur Bestimmung von Verunreinigungen durch Lymphozyten wurden Kontrollfärbungen mit CD3 (Biotin + SA 10 PERCP – in FL3 positiv) bzw. CD3-FITC für T-Lymphozyten und CD20 FITC bzw. CD19-PE für B-Lymphozyten durchgeführt. Im Durchschnitt liegt nach Isolierung die CD3-Expression bei ca. 1% und die CD19-Expression ist mit <1% vernachlässigbar.

4.2.2 Sekundärantikörpertest gegen den monoklonalen humanen TF-AK (VIC7)

Sekundärantikörper sind gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers anti humanen TF gerichtet. Allgemein wird eine hohe Sensitivität und Spezifität garantiert, es kommt jedoch teilweise zu Kreuzreaktionen mit humanen Zellstrukturen.

Die Abbildungen 12-13 zeigen die Proben 1-4 von Patienten, die direkt mit den Sekundärantikörpern anti Maus IgG (Sigma) und anti Maus IgG (Dako) inkubiert wurden.



In Abbildung 12 sind unspezifische Banden in unterschiedlichen Molekulargewichtsbereichen zu erkennen. Der Sekundärantikörper anti Maus IgG (Sigma) zeigt eine Kreuzreaktion und wurde nicht für diese Studie verwendet. In Abbildung 13 kann man nur das Ende der Elektrophoresefront erkennen. Dieser Sekundärantikörper (anti Maus IgG, Firma Dako) zeigt somit keine Kreuzreaktion.

4.2.3 Nachweis der Spezifität von human Tissue Factor-AK und ICAM1-AK

Die Hersteller garantieren zwar eine hohe Spezifität der Primärantikörper, dennoch treten trotz intensiver Blockierung Kreuzreaktionen mit den Determinanten von unspezifischen Antigenen auf. Somit ist die weitere Datenanalyse (Bandendetektion, optische Dichtemessung) nicht möglich. Die Spezifität des Antikörpers VIC7 wurde anhand von rekombinatem Tissue Factor und maternalem Plazentagewebe von Präeklampsie Patientinnen getestet. Die Abbildungen 14 und 15 zeigen Banden im Molekularbereich von 47 kDa, die das Protein TF repräsentieren.

Abb.14

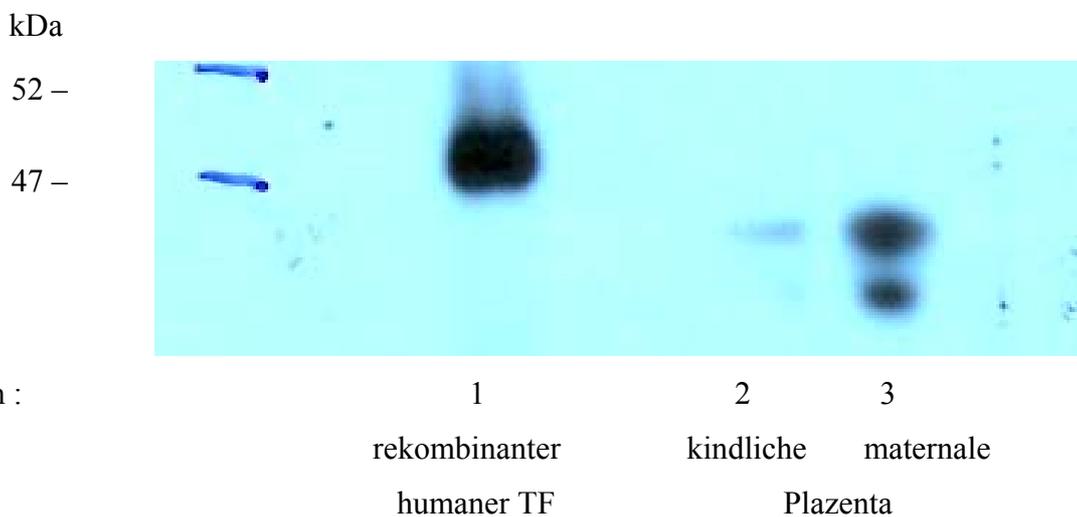
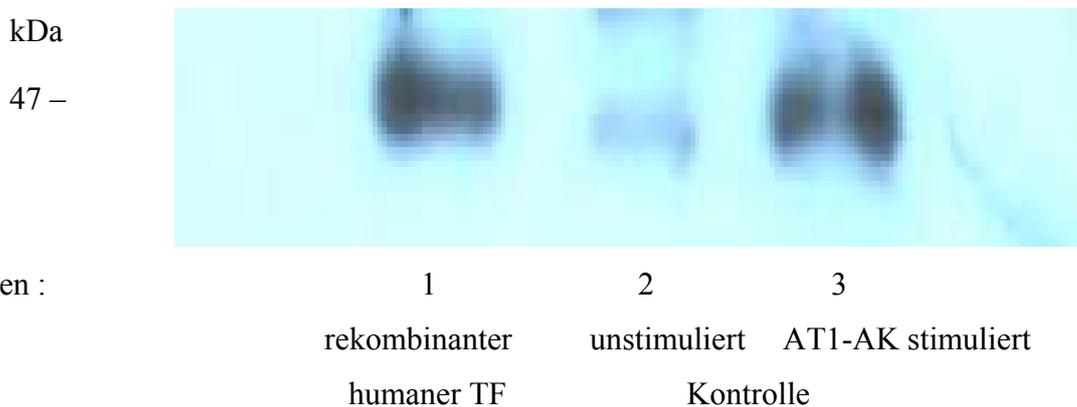


Abb.15



Unstimulierte und AT1-AK stimulierte Kontrollen wurden mit dem TF-AK VIC7 inkubiert. Als Referenz diente rekombinanter humaner TF. Der Antikörper bindet spezifisch an den humanen TF. Weiterhin ist eine Expressionssteigerung nach AT1-AK-Stimulation der Kontrolle erkennbar.

Entsprechende Untersuchungen wurden für den anti humanen ICAM1-Antikörper durchgeführt. Die Abbildungen 16 und 17 zeigen Banden im Molekularbereich von 95 kDa, die das Adhäsionsmolekül ICAM1 repräsentieren.

Abb.16

kDa

113 –

82 –



Proben :

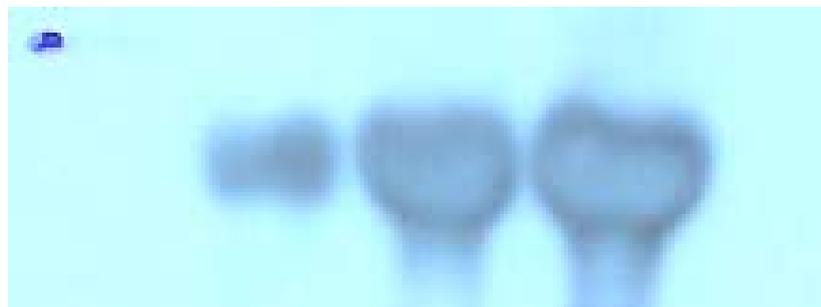
1	2	3
5µg	10µg	rekombinant humanes
LPS stimulierte Kontrolle		ICAM1

Abb.17

kDa

113 –

82 –



Proben :

1	2	3
5µg	10µg	rekombinant humanes
AT stimulierte Kontrollen		ICAM1

Der monoklonale anti ICAM1-AK bindet spezifisch an humanes ICAM1. Weiterhin ist eine Expression der normotensiven Normalkontrollen nach LPS- und AT-Stimulation zu erkennen.

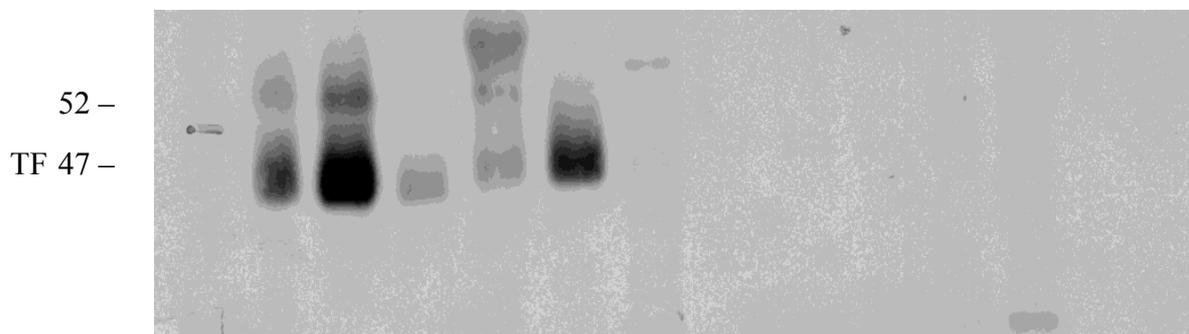
4.3 Nachweis von Tissue Factor mittels Western Blot

4.3.1 Vergleich zwischen Monozyten von Hypertonikern versus Normalkontrollen

Die Abbildung 18 zeigt Banden im Molekularbereich von 47 kDa, die das Protein TF präsentieren. Die Proben 1-2 dienen als Referenzkontrolle und repräsentieren Plazentagewebe von Präeklampsie Patientinnen. Die Probe a enthält einen Farbmärker zur Skalierung des Molekulargewichtes (Markierung in Höhe von 52 kDa).

Die Proben 3-6 repräsentieren Monozyten von Hypertoniepatienten, die Proben 7-10 Normalkontrollen.

Abb.18



Proben : a 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 Farbmärker Plazenta Patienten Normalkontrollen

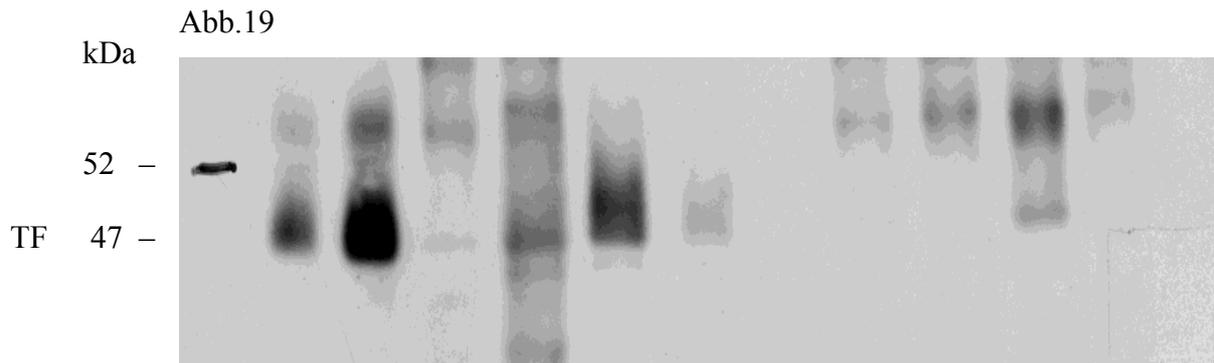
Daten zu Abbildung 18 :

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Odxmm	2.751	4.790	1.003	0.962	3.213	0.418	0.032	0.045	0.056	0.019

Die Auswertung der Banden erfolgte computergestützt mittels optischer Dichtemessung (optische Densität x mm).

Die Abbildung 19 zeigt Banden im Molekularbereich von 47 kDa, die das Protein TF repräsentieren. Die Proben 1-2 repräsentieren als Referenzkontrolle das Plazentagewebe von Präeklampsie Patientinnen. Die Probe a enthält einen Farbmarker zur Skalierung des Molekulargewichtes (Markierung in Höhe von 52 kDa).

Die Proben 3-6 repräsentieren Monozyten von Hypertoniepatienten, die Proben 7-10 Normalkontrollen.



Proben : a 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 Farbmarker Plazenta Hypertoniepatienten Normalkontrollen

Daten zu Abbildung 19:

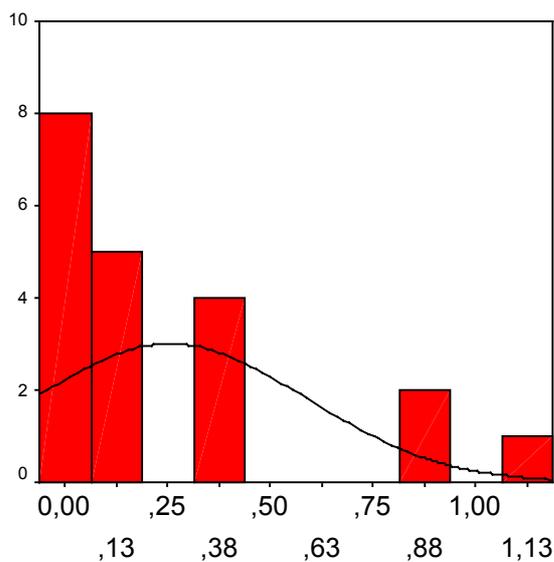
Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Odxmm	3.804	7.253	0.202	2.503	3.997	1.054	0.321	0.134	1.141	0.313

Die Auswertung der Banden erfolgte computergestützt mittels optischer Dichtemessung (optische Densität x mm).

4.3.2 Statistische Auswertung und Korrelationen der Tissue Factor Studie

In Abbildung 20 ist die Häufigkeitsverteilung der TF-Expression in OD x mm (optische Densität) bei Normalkontrollen und Hypertoniepatienten dargestellt.

Abb.: 20

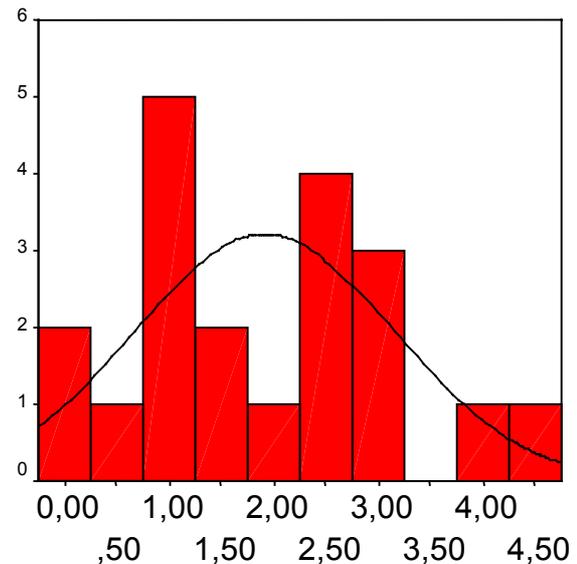


Verteilung der TF-Expression bei Normalkontrollen

Standardabweichung : 0,33

Mittelwert : 0,26

N : 20



Verteilung der TF-Expression Hypertoniepatienten

Standardabweichung : 1,24

Mittelwert : 1,92

N : 20

Die Häufigkeit der TF-Expression ist in den beiden Studiengruppen unterschiedlich verteilt. Während Normalkontrollen relativ selten TF exprimieren, ist die Expression bei Patienten deutlich häufiger.

In Tabelle 4 sind Rangtest (U-Test), Mittelwerte und Fallzahl (N) der TF-Expression bei Hypertonikern im Vergleich zu Normalkontrollen angegeben.

Tab.4

Ränge

	Studiengruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Tissue factor Expression	Hypertoniker	20	29,15	583,00
	Normalkontrollen	20	11,85	237,00
	Gesamt	40		

In Tabelle 5 ist das Ergebnis des Mann-Whitney-U Testes - Vergleich der TF-Expression bei Hypertoniepatienten zu Normalkontrollen angegeben.

Tab.5

	TF Expression
Mann-Whitney-U	27,000
Wilcoxon-W	237,000
Z	-4,680
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,000 ^a

a. Nicht für Bindungen korrigiert.

Die Expression von TF ist bei Hypertoniepatienten im Vergleich zu Normalkontrollen signifikant ($p = 0,000$) erhöht.

Da die Expression von TF bei Hypertoniepatienten im Vergleich zu Normalkontrollen signifikant erhöht ist, wurde das Ergebnis auf mögliche Korrelationen mit den Variablen systolischer und diastolischer Blutdruck, Alter und Geschlecht untersucht.

In der Tabelle 6 ist die Korrelation der TF-Expression für systolischen Blutdruck angegeben.

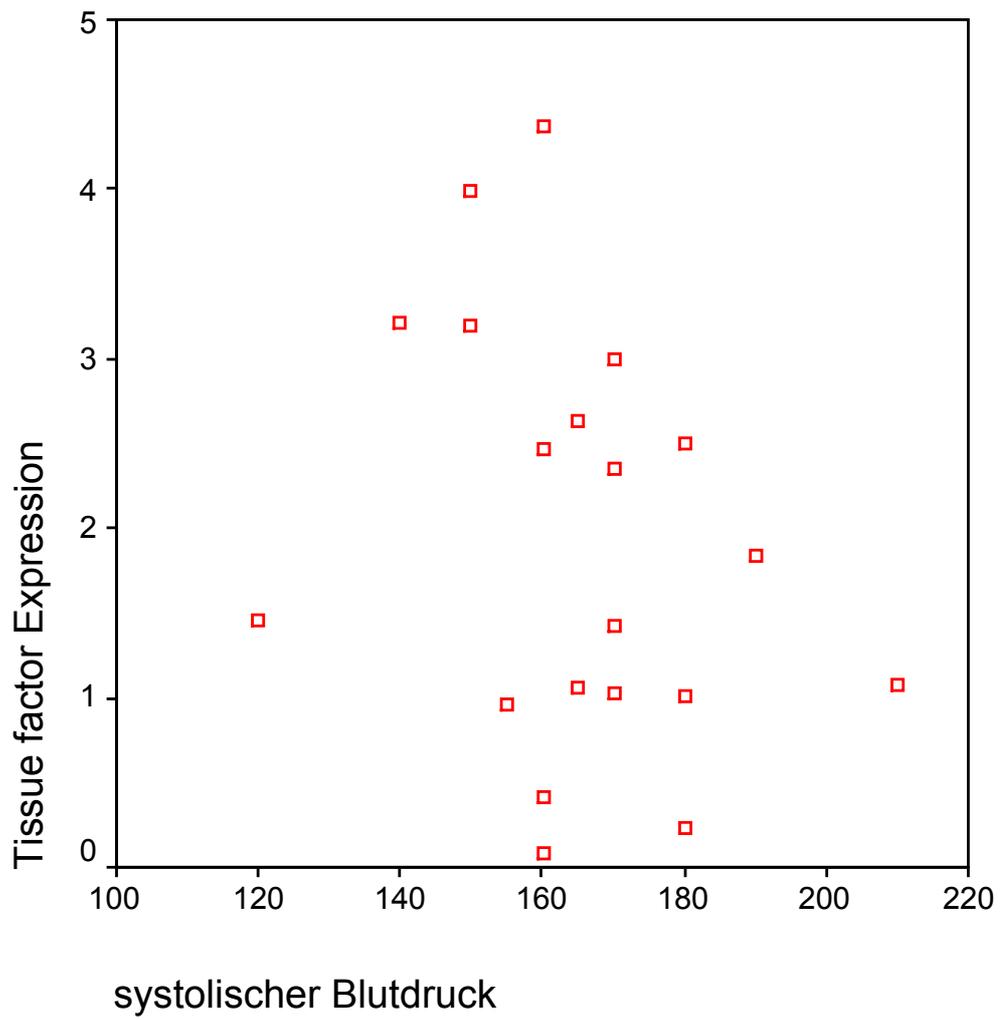
Tab.6

		systolischer Blutdruck	TF Expression
systolischer Blutdruck	Korrelation nach Pearson	1	,467*
	Signifikanz (2-seitig)	,	,038
	N	20	20
Tissue Factor Expression	Korrelation nach Pearson	,467*	1
	Signifikanz (2-seitig)	,038	,
	N	20	20

*. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Die TF-Expression bei Hypertoniepatienten korreliert signifikant ($p = 0,038$) mit dem systolischen Blutdruck.

Abb.: 21



In Abbildung 21 ist die Korrelation zwischen der TF-Expression und dem systolischen Blutdruck bei Hypertoniepatienten dargestellt.

In der Tabelle 7 ist die Korrelation zwischen TF-Expression in (OD x mm) und dem diastolischen Blutdruck angegeben.

Tab.7

		diastolischer Blutdruck	Tissue factor Expression
diastolischer Blutdruck	Korrelation nach Pearson	1	-,085
	Signifikanz (2-seitig)	,	,722
	N	20	20
Tissue factor Expression	Korrelation nach Pearson	-,085	1
	Signifikanz (2-seitig)	,722	,
	N	20	20

Die TF-Expression korreliert nicht signifikant ($p = 0,722$) mit dem diastolischen Blutdruck.

In der Tabelle 8 ist die Korrelation zwischen TF-Expression (OD x mm) und dem Alter angegeben.

Tab.8

		Tissue factor Expression	Alter
Tissue factor Expression	Korrelation nach Pearson	1	-,044
	Signifikanz (2-seitig)	,	,853
	N	20	20
Alter	Korrelation nach Pearson	-,044	1
	Signifikanz (2-seitig)	,853	,
	N	20	40

Die TF-Expression korreliert nicht signifikant ($p = 0,853$) mit dem Alter.

In den Tabelle 9 ist die Korrelation zwischen TF-Expression (OD x mm) und dem Geschlecht angegeben.

Tab.9

		Tissue factor Expression	Geschlecht
Tissue factor Expression	Korrelation nach Pearson	1	-,282
	Signifikanz (2-seitig)	,	,228
	N	20	20
Geschlecht	Korrelation nach Pearson	-,282	1
	Signifikanz (2-seitig)	,228	,
	N	20	40

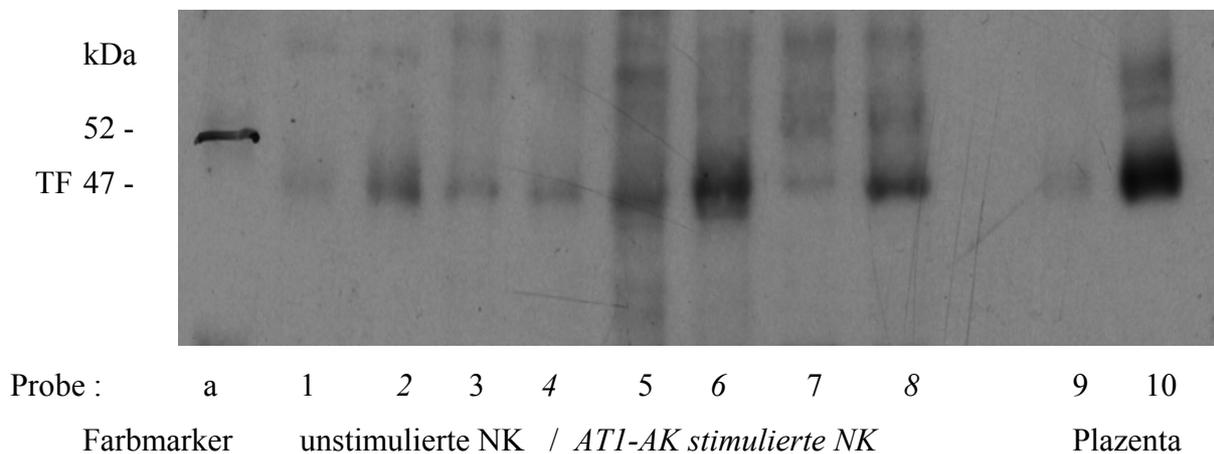
Die TF-Expression korreliert nicht signifikant ($p = 0,228$) mit dem Geschlecht.

4.4 Vergleich zwischen AT1-AK stimulierten und unstimulierten Monozyten von Normalkontrollen

In den Studien von Wallukat und Dechend konnten AT1-AK vermittelte agonistische Effekte am AT1-Rezeptor belegt werden (Wallukat G 1999, Dechend R 2000). Es wurde die Hypothese einer möglichen Beeinflussung der TF-Expression nach Stimulation mit dem Antikörper aufgestellt. In der Versuchsreihe wurden 8 unstimulierte gegenüber 8 AT1-AK stimulierten Normalkontrollen bezüglich der TF-Expression verglichen.

Die Abbildung 22 zeigt Banden im Molekularbereich von 47 kDa, die das Protein TF repräsentieren. Die Außenbahn a wurde mit einem Farbmarker beladen.

Abb.22



Daten zu Abbildung 22:

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Odxmm	0.024	0.384	0.141	0.229	0.330	1.962	0.074	1.404	0.292	3.356

Die Proben 2,4,6 und 8 repräsentieren AT1-AK stimulierte Normalkontrollen, die Proben 1,3,5 und 7 unstimulierten Normalkontrollen. Die Proben 9-10 enthalten Plazentagewebe einer Präeklampsie Patientin als Referenz (Probe 9: fetale Plazenta, Probe 10: maternale Plazenta). Die Auswertung der Banden erfolgte computergestützt mittels optischer Dichtemessung (OD x mm).

In Tabelle 10 sind die Fallzahl N, der Mittelwert und der Rang für die TF-Expression bei AT1-AK stimulierten und unstimulierten Normalkontrollen angegeben.

Tab.10

		Ränge		
		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Tissue factor Expression bei AT1-Antikörper stimulierten Normalkontrollen versus unstimulierte Normalkontrollen	Negative Ränge	0 ^a	,00	,00
	Positive Ränge Bindungen	8 ^b	4,50	36,00
Gesamt		8		

a. TF Expression AT1 AK stimulierte NK < unstimulierte NK

b. TF Expression AT1 AK stimulierte NK > unstimulierte NK

c. TF Expression AT1 AK stimulierte NK = unstimulierte NK

In Tabelle 11 sind die Ergebnisse des T-Testes bei gepaarten Stichproben für den Vergleich der TF Expression bei AT1-AK stimulierten zu unstimulierten Normalkontrollen angegeben.

Tab.11

Statistik für Test^b

	TF Expression AT1 AK stimuliert NK - unstimuliert NK
Z	-2,521 ^a
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,012

a. Basiert auf negativen Rängen.

b. Wilcoxon-Test

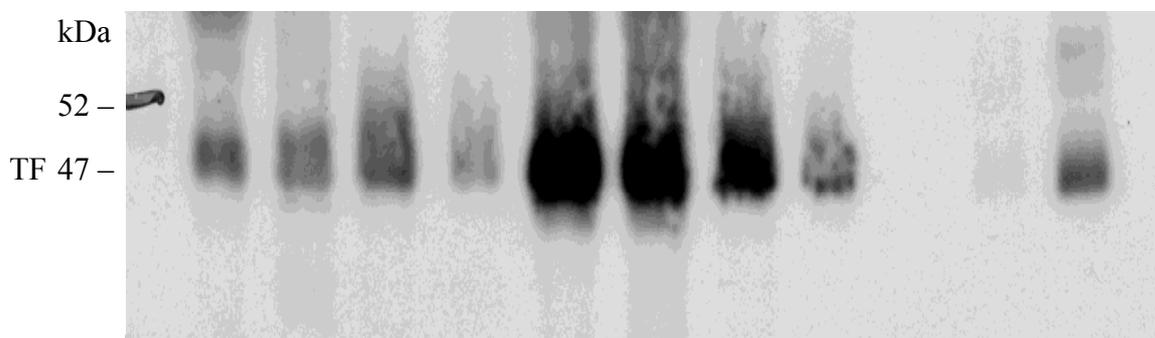
Die TF-Expression der AT1-AK stimulierten Normalkontrollen ist signifikant ($p = 0,012$) erhöht.

4.4.1 Vergleich zwischen AT1-AK stimulierten und unstimulierten Monozyten von Hypertonikern

Im Anschluss erfolgte analog zu den normotensiven Kontrollen der Vergleich zwischen AT1-AK stimulierten und unstimulierten Hypertoniepatienten.

Die Abbildung 23 zeigt Banden im Molekularbereich von 47 kDa, die das Protein TF repräsentieren. Die Probe a enthält einen Farbmarker.

Abb.:23



Probe : a 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 Farbmarker AT1-AK stimulierte Patienten / *unstimulierte Patienten* Plazenta

Daten zu Abbildung 23 :

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Odxmm	2.543	2.478	3.502	1.740	6.593	6.667	5.253	2.914	0.250	2.514

In Abbildung 23 repräsentieren die Proben 2,4,6 und 8 die unstimulierten, die Proben 1,3,5 und 7 die AT1-AK stimulierten Monozyten von Hypertoniepatienten. Die Proben 9-10 enthalten Plazentagewebe einer Präeklampsie Patientin als Referenz (Probe 9: fetale Plazenta, Probe 10: maternale Plazenta). Die Auswertung der Banden erfolgte computergestützt mittels optischer Dichtemessung (OD x mm).

In Tabelle 12 sind die Fallzahl N, der Mittelwert und der Rang für die TF-Expression bei AT1-AK stimulierten und unstimulierten Hypertoniepatienten angegeben.

Tab.12

		Ränge		
		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Tissue factor	Negative Ränge	2 ^a	5,00	10,00
Expression bei AT1 AK	Positive Ränge	6 ^b	4,33	26,00
stimulierten und	Bindungen	0 ^c		
unstimulierten	Gesamt	8		
Hypertoniepatienten				

- a. AT1 AK stimuliert < unstimuliert
- b. AT1 AK stimuliert > unstimuliert
- c. AT1 AK stimuliert = unstimuliert

In Tabelle 13 sind die Ergebnisse des T-Testes bei gepaarten Stichproben für den Vergleich der TF-Expression bei AT1-AK stimulierten und unstimulierten Hypertoniepatienten angegeben.

Tab.13

Statistik für Test^b

	AT1 AK stimuliert - unstimuliert
Z	-1,120 ^a
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,263

- a. Basiert auf negativen Rängen.
- b. Wilcoxon-Test

Die tendenzielle Steigerung der TF-Expression bei AT1-AK stimulierten Patienten ist zwar zu erkennen, jedoch nicht statistisch signifikant.

In Tabelle 14 sind die Fallzahl N, der Mittelwert und der Rang für die TF-Expression bei AT1-AK stimulierten Hypertoniepatienten und AT1-AK stimulierten Normalkontrollen angegeben.

Tab.14

Ränge

		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Normalkontrollen - Hypertoniepatienten	Negative Ränge	1 ^a	3,00	3,00
	Positive Ränge	7 ^b	4,71	33,00
	Bindungen	0 ^c		
	Gesamt	8		

- a. stimulierte Hypertoniepatienten < stimuliert Normalkontrollen
- b. stimulierte Hypertoniepatienten > stimulierte Normalkontrollen
- c. stimulierte Hypertoniepatienten = stimulierte Normalkontrollen

In Tabelle 15 sind die Ergebnisse des T-Testes bei gepaarten Stichproben für den Vergleich der TF-Expression bei AT1-AK stimulierten Hypertoniepatienten und Normalkontrollen angegeben.

Tab.15

Statistik für Test^b

	Hypertoniker - Normalkontrollen
Z	-2,100 ^a
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,036

- a. Basiert auf negativen Rängen.
- b. Wilcoxon-Test

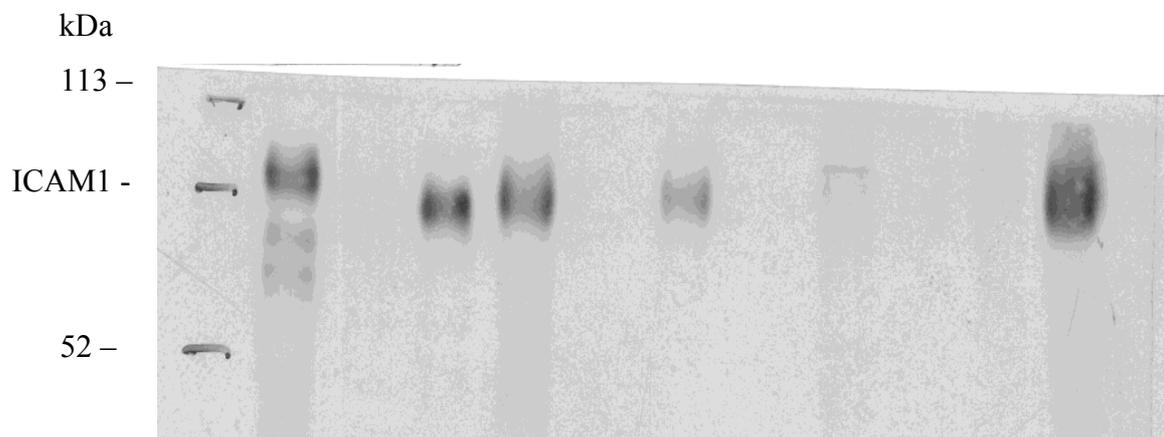
Die TF-Expression bei Hypertoniepatienten ist signifikant erhöht. Das Ergebnis ist jedoch mit der Einschränkung der ohnehin gesteigerten TF-Expression zu werten.

4.5 Messung des Adhäsionsmoleküls ICAM1 mittels Western Blot

4.5.1 Vergleich zwischen Monozyten von Hypertonikern versus Normalkontrollen

Die Abbildungen 24-25 zeigen Banden im Molekularbereich von 95 kDa. Die Proteindetektion erfolgte mittels eines monoklonalen Maus Antikörper (anti ICAM1-AK). Als Referenz dienten genmanipulierte HUVEC mit einer Überexpression von ICAM1 (Probe 9). Die Probe a enthält einen Farbmaler.

Abb. 24 :



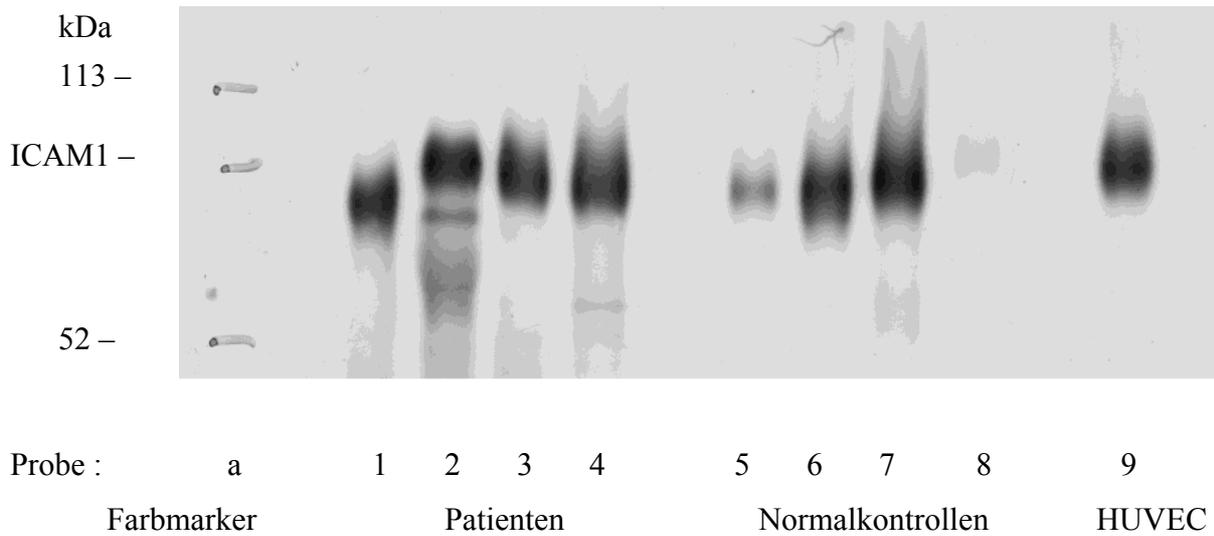
Probe : a 1 2 3 4 5 6 7 8 9
 Farbmaler Patienten Normalkontrollen HUVEC

Daten zu Abbildung 24 :

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ODxmm	1.440	0.005	1.605	1.418	0.903	0.288	0.001	0.125	3.128

Die Proben 1-4 repräsentieren Monozyten von Hypertoniepatienten, die Proben 5-8 normotensive Kontrollen. Die Banden repräsentieren das Adhäsionsmolekül ICAM1. Die Ergebnisse wurden mittels optischer Dichtemessungen quantifiziert (OD x mm).

Abb. 25



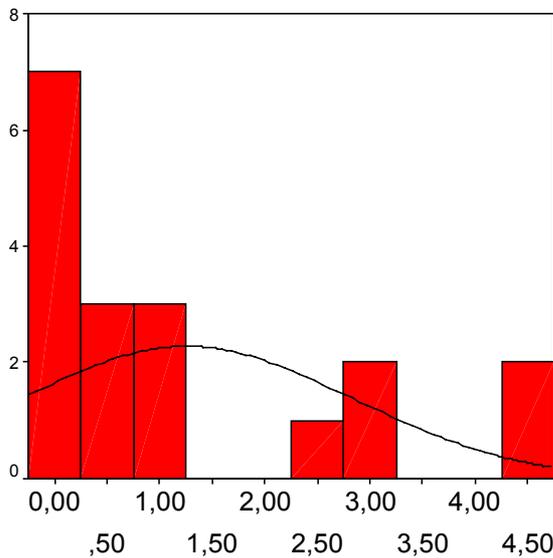
Daten zu Abbildung 25 :

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ODxmm	3.058	2.867	2.935	2.518	0.869	2.524	3.207	0.213	3.296

Die Proben 1-4 repräsentieren Monozyten von Hypertoniepatienten, die Proben 5-8 normotensive Kontrollen. Als Referenzkontrolle dienten genmanipulierte HUVECS mit einer Überexpression von ICAM1 (Probe 9). Die Banden liegen im Molekularbereich von 95 kDa. Die Auswertung der Banden erfolgte mittels optischer Dichtemessung (OD x mm).

In Abbildung 26 ist die Häufigkeitsverteilung der ICAM1-Expression in OD x mm bei Normalkontrollen und Hypertoniepatienten dargestellt.

Abb.: 26

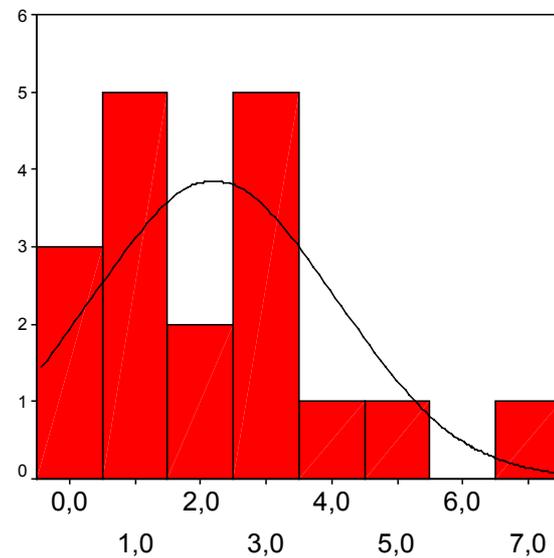


Standardabweichung : 1,57

Mittelwert : 1,26

N : 18

Verteilung der ICAM1 Expression bei Normalkontrollen



Standardabweichung : 1,86

Mittelwert : 2,2

N : 18

Verteilung der ICAM1 Expression bei Hypertoniepatienten

Die Häufigkeit der ICAM1 Expression ist in den beiden Studiengruppen unterschiedlich verteilt. Die Normalkontrollen exprimieren im Vergleich zu den Patienten tendenziell seltener ICAM1.

In Tabelle 14 sind Rangtest (U-Test), Mittelwerte und Fallzahl (N) der ICAM1-Expression bei Hypertonikern im Vergleich zu Normalkontrollen angegeben.

Tab.14

Ränge

Studiengruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
ICAM1 Expression Hypertoniepatienten	18	21,56	388,00
ICAM1 Expression Normalkontrollen	18	15,44	278,00
Gesamt	36		

In Tabelle 15 ist das Ergebnis des Mann-Whitney-U Testes - Vergleich der ICAM1 Expression bei Hypertoniepatienten zu Normalkontrollen angegeben.

Tab.15

	ICAM 1 Expression
Mann-Whitney-U	107,000
Wilcoxon-W	278,000
Z	-1,740
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,082
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,085 ^a

a. Nicht für Bindungen korrigiert.

Die ICAM1 Expression bei Hypertoniepatienten ist im Vergleich zu Normalkontrollen nicht signifikant ($p = 0,085$) erhöht.

5 Diskussion

5.1 Rolle der Monozyten bei der Arteriosklerosegenese im Rahmen der essentiellen Hypertonie

In jüngster Zeit wurde erneut auf die klinische Bedeutung des Immunsystems bei der Pathogenese der arteriellen Hypertonie hingewiesen (Schillaci G 2007; Ishikawa J 2007).

Als Vorläuferzellen des mononukleären Phagozytosesystems sind Monozyten in zahlreiche pathophysiologische Prozesse involviert. Hierzu zählen Entzündungsreaktionen, Wundheilung, maligne Neubildungen, Thrombose und Arteriosklerose. Insbesondere bezüglich der Arteriosklerosegenese ist die Beteiligung der Monozyten von entscheidender Bedeutung. Interessanterweise ist ihre Anzahl bei arterieller Hypertonie erhöht (Mills PJ 2002). Die Fähigkeit der Zellen zur Adhäsion, Migration und Transformation basiert auf einem vielfältigen Interaktions- und Kommunikationsschema. Die Funktion dieses Schemas ist noch nicht komplett verstanden. Einige der beteiligten Komponenten sind Interleukine, Adhäsions- und Koagulationsmediatoren.

Mehrere Studien belegen, dass Monozyten auf unterschiedliche Art und Weise durch physikalische Faktoren beeinflusst werden. So führt hoher Druck zu einer Adhäsion der Zellen an die Gefäßwand (Riou S 2007). Inflammatorische Gene u.a. das Gen für Interleukin 8 konnte nach mechanischer Belastung in Monozyten nachgewiesen werden (Ohki R 2002). Sakamoto kam zu dem Ergebnis, dass biomechanische Belastung die Scavenger Rezeptor Expression auf Monozyten induziert (Sakamoto H 2001). Die Folgerung aus den Studien lautet, dass physikalischer Druck das Adhäsions- und Expressionsverhalten von Monozyten beeinflusst und ein inflammatorischen Prozess induziert wird. Monozyten sind somit an der Entwicklung der Hypertonie assoziierten Entzündungsreaktion maßgeblich beteiligt.

Aufgrund der schwierigen Isolierung der Zellen ist die Datenlage nur spärlich. In dieser Studie wurde gezeigt, dass Monozyten mit hohem Reinheitsgrad und geringer Isolierungsbedingter Voraktivierung gewonnen werden konnten.

Bei dem Vergleich zwischen Hypertoniepatienten und normotensiven Kontrollen fiel eine gesteigerte Aktivierung und Adhäsion an Endothelzellen auf (Dörffel Y 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte eine Modifikation des Expressionsmusters im Sinne einer gesteigerten Expression von Oberflächenmolekülen nachgewiesen werden. Diese Oberflächenmoleküle präsentieren molekulare Komponenten im Rahmen von Aktivierungs- und Adhäsionsprozessen.

Weiterhin konnte nach Stimulation mit einem Antikörper die Expression induziert werden. Die Ergebnisse der Untersuchung untermauern die Hypothese, dass ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung von Monozyten durch erhöhten Blutdruck und der Ausbildung der Arteriosklerose besteht.

5.2 Evaluation der Einflussfaktoren

Das Expressionsverhalten von Monozyten unterliegt zahlreichen unterschiedlichen Einflussfaktoren. Hierzu zählen in erster Linie inflammatorische Prozesse, Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Malignome und Hyperlipoproteinämie. Ebenso sind Medikamente, exogene Noxen und Umweltfaktoren zu berücksichtigen.

In einer Vielzahl von prospektiven Studien konnte ein relevanter Zusammenhang zwischen systemischen Inflammationsmarkern wie Zytokine (IL-6, TNF-alpha), Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin) und verschiedene akute-Phase-Proteine, z. B. C-reaktives Protein (CRP), und kardiovaskulären Endpunkten nachgewiesen werden (Blake GJ 2002). Daher galt die Erhöhung des Infektparameters CRP als Ausschlusskriterium.

Diabetes mellitus ist eng mit der Arteriosklerosegenese assoziiert. Dabei können sogenannte nicht enzymatisch glykierte Endprodukte (advanced glycation endproducts, AGEs) intrazelluläre Signalmechanismen induzieren. Zu den AGEs zählt das HbA1c, welches nach Bindung an einen spezifischen Rezeptor (receptor for advanced glycation endproducts; RAGE) zur TF-Expression auf Monozyten führt (König W 2001; Buchs AE 2004). Diabetes mellitus galt in dieser Studie als Ausschlusskriterium.

Exogene Noxen (Nikotin) und Medikamente (orale Kontrazeptiva) führten zu einer erhöhten TF-Expression auf Monozyten von Frauen (Hölschermann H 1999) und galten daher ebenfalls als Ausschlusskriterium. Ob das weibliche Geschlecht an sich als Einflussfaktor gewertet werden kann ist unklar. In der Studie von Dörffel 2001 konnte keine Korrelation zwischen der Adhäsion von Monozyten an HUVEC und dem Geschlecht nachgewiesen werden. Die Studiengruppen dieser Arbeit weisen eine identische Geschlechterverteilung auf.

In Publikationen von Gimbrone und Cybulsky wurde darauf hingewiesen, dass Hypercholesterinämie zu einer vermehrten Monozytenadhäsion führt (Gimbrone MA 1990;

Cybulsky MI 1991). Weiterhin konnte Ferro belegen, dass Hypercholesterinämie zu einer gesteigerten Zytokinproduktion führt, was wiederum eine Voraktivierung begünstigen würde (Ferro D 2000). Patienten mit erhöhten Cholesterin Serumwerten wurden daher ausgeschlossen.

5.3 Methodenkritik

5.3.1 Beeinträchtigung durch den Isolierungsprozess

Im Rahmen der bisherigen Isolierungsversuche von Monozyten aus Vollblut wurden die Verfahren Plastikadhärenz und Dichtegradientenzentrifugation angewandt. Dabei kam es jedoch zu einer erheblichen Beeinflussung des Expressionsverhaltens. Stent beschreibt eine gesteigerte Expression von ICAM1 und CD 11b (Stent G 1997). Neben diesem unerwünschten Effekt war die Ausbeute und die Spezifität dieser Isolierungsverfahren gering. Mit dem Negativ-Isolierungsverfahren steht eine Methode zur Verfügung, die sowohl eine ausgeprägte Reinheit als auch eine hohe Ausbeute gewährleistet. Anhand von Trypanblaufärbungen konnte nach Isolierung eine Vitalität von >95% ermittelt werden. Somit ist das Verfahren hinsichtlich der Zytotoxizität äußerst schonend.

5.3.2 Beeinträchtigung durch Inkubation

Monozyten weisen eine ausgeprägte Plastikadhärenz auf. Gleichzeitig wird eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen beobachtet. Die Versuche wurden daher in Polypropylengefäßen zur Vermeidung des Adhäsionsprozesses durchgeführt. Die Inkubationszeiten wurden auf eine maximale Dauer von 12-24h beschränkt.

5.4 Nachweismethoden und Datenauswertung

Die Probenherstellung und –verarbeitung erfolgte nach standardisierten Abläufen :

- Lysierung der Monozyten
- Proteinbestimmung nach Lowry
- Western Blot mittels SDS-PAGE System nach Laemmli
- Bandendetektion und Berechnung der optischen Densität mittels „Quantity One“

5.4.1 Lysierung und Proteinbestimmung

Nach der Monozytenisolation und –stimulation erfolgte die Lysierung der Zellen. Das Lysat wurde mittels der Proteinbestimmung nach Lowry auf den Proteingehalt untersucht. Dabei erfolgte die regelmäßige Eichung des Gerätes und die Anfertigung von Eichkurven. Die Proben wurden aliquotiert. Die Proteinprobenmenge betrug konstant 10 µg.

5.4.2 Standardisierung der Untersuchungsmethode Western Blot

Zunächst erfolgte die Detektion von Proteinen mit ähnlichem Molekulargewicht, um die optimale Gitterstruktur des Elektrophoresegels zu ermitteln. Es wurden myokardiale Zellen der Ratte auf α - und β -Myosin untersucht.

Anschließend erfolgte die Antikörpertestung der Primär- und Sekundärantikörper hinsichtlich der Spezifität und möglicher Kreuzreaktion. Anfangs wurde ein polyklonaler Antikörper verwendet. Da polyklonale Antikörper aus den Seren von Menschen oder Tieren gewonnen werden, kann die Affinität (Stabilität einer einzelnen AG-AK-Bindung) und die Avidität (Stärke der Bindung eines multivalenten Antigen durch multivalente Antikörper) bei jeder neuen Charge unterschiedlich sein.

Polyklonale Antikörper werden gegen die verschiedenen Determinanten (Epitope) des Antigens gebildet. Es liegt immer eine Mischung verschiedener Antikörper gegen ein Antigen vor. Die Antikörper unterscheiden sich dabei hinsichtlich der Spezifität.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass verschiedene Antigene einzelne gleiche Determinanten besitzen und somit der Antikörper mit den Determinanten dieser verschiedenen Antigene reagiert. Im Rahmen der Antikörpertestung konnte eine Kreuzreaktion des polyklonalen Primärantikörper anti human TF (Loxo) nachgewiesen werden. Somit wurde der Antikörper nicht für diese Studie verwendet.

Analog fiel eine Kreuzreaktion des Sekundärantikörper Anti-Maus IgG (Sigma) auf. Dieser Sekundärantikörper kam somit ebenfalls nicht zum Einsatz.

Monoklonale Antikörper entstammen einem einzigen Plasmazellklon. Sie sind alle gleich und gegen nur eine Determinante des Antigens gerichtet. Die Affinität des Antikörpers zum Antigen ist konstant. Das Antiserum ist monospezifisch, Kreuzreaktionen kann man bei sorgfältiger Wahl des Antikörpers ausschließen.

Zur Proteindetektion von Tissue Factor wurde daraufhin der monoklonale Antikörper (Klon VIC7) verwendet. Als konstante Referenzkontrolle diente Plazentagewebe von Präeklampsie

Patientinnen und rekombinante Proteine. Zusätzlich wurden Farbmarker zur Orientierung am Molekulargewicht eingesetzt.

5.4.3 Standardisierung der Datenauswertung

Da die Banden hinsichtlich der Größe und Intensität zum Teil deutlich variieren erfolgte die Auswertung der Röntgenfilme computergestützt (Programm : Quantity one, Max Delbrück Zentrum Berlin). Dabei wurden die Banden nach Abzug der Hintergrundschwärzung detektiert, gematched und die optische Dichte (OD) bestimmt. Somit war eine standardisierte Auswertung der Proteindetektion gewährleistet.

5.4.4 Auswahl der statistischen Verfahren

Initial erfolgte eine Berechnung der Verteilung und grafische Darstellung der zu untersuchenden Größe innerhalb der Studiengruppe

Für den Vergleich der TF- und ICAM1 Expression zwischen Hypertoniepatienten und Normalkontrollen wurde der nicht-parametrische Mann Whitney U-Test gewählt. Da es sich bei dem Vergleich der TF-Expression zwischen unstimulierten und AT1 AK-stimulierten Probanden um eine Untersuchung innerhalb der gleichen Untersuchungsgruppe handelt wurde der T-Test verwendet.

5.5 Aktivierung und Adhäsion peripherer Monozyten

Periphere Monozyten werden durch den Kontakt mit Oberflächen wie arteriosklerotischen Plaques oder durch proinflammatorische Mediatoren aktiviert. Dies führt konsekutiv zu einer gesteigerten Sezernierung von Zytokinen und einer Expression von Oberflächenmolekülen (Integrine), deren Charakterisierung laufenden Studien unterliegt.

Im Tierexperiment konnte bei SHR (spontan hypertensive Ratten) vermehrt aktivierte Monozyten im Blut nachgewiesen werden (Schmid Schönbein 1991). Entsprechende Studien am Menschen weisen darauf hin, dass sowohl die Anzahl der Monozyten bei arterieller Hypertonie erhöht ist (Mills PJ 2002), als auch ein gesteigerter Aktivierungszustand vorliegt. Dieser Aktivierungszustand wurde anhand einer vermehrten Sekretion der proinflammatorischer Zytokine IL-1 β , TNF- α und IL-6, der Superoxidproduktion und der aktivierungsabhängigen Oberflächenmarker ermittelt (Dörffel Y 2003).

Hinsichtlich der Adhäsion spielen unterschiedliche Faktoren eine Rolle. Untersuchungen von Clozel zeigen, dass bei SHR sowohl eine Monozyten Akkumulation als auch eine endotheliale Dysfunktion vorliegen (Clozel M 1991). Klinische und pharmakologische Studien verweisen seit einiger Zeit auf eine Hypertonie assoziierte Genese arteriosklerotischer Gefäßwandschäden (Kannel WB 1993; Diez J 2006).

Die vorgelegte Arbeit basiert ebenfalls auf der Auffassung einer blutdruckabhängigen Prädisposition für arteriosklerotische Plaquebildung und unterstützt diese These anhand der folgenden Ergebnisse.

5.6 Tissue Factor Expression bei Hypertonikern

TF ist allgemein als Initiator der Gerinnung bekannt und kommt in sämtlichen Organen des Körpers vor. Albrecht und Luther 1992 gelang die Entwicklung eines Nachweisverfahrens, welches hochsensitiv ohne Beeinflussung anderer Gerinnungsfaktoren und insbesondere bei geringer Zellzahl die Bestimmung von TF ermöglicht (Albrecht S 1992/1996).

Aktuell befindet sich das Verständnis seiner Herkunft und Funktion im Wandel. Übereinstimmung herrscht bei der Einteilung in eine zelluläre, mikropartikuläre und lösliche Komponente.

Während Astrozyten, Epithelzellen, Fibroblasten und kardiale Myozyten konstant TF exprimieren, ist die Exposition auf Endothelzellen und Monozyten unter physiologischen Bedingungen gering. Dafür ist eine Aktivierung der Zellen erforderlich. Folglich wird TF bei inflammatorischen Prozessen, Diabetes mellitus oder akutem Koronarsyndrom innerhalb von Minuten auf der Zelloberfläche exponiert (Osterud B 2006; Reinhardt C 2007).

Studien von Dörffel ergaben, dass Monozyten bei arterieller Hypertonie aktiviert sind (Dörffel Y 2003). Ziel der vorliegenden Arbeit war, molekulare Mechanismen als Zeichen der Aktivierung an Monozyten zu untersuchen. Im Mittelpunkt der Studie stand daher das Expressionsverhalten der Zellen - insbesondere die TF Expression, da dieses Protein in einer Reihe von Pathomechanismen unterschiedlicher Erkrankungen involviert ist.

Der TF spielt im Rahmen von onkologischen- und Autoimmunerkrankungen eine zentrale Rolle (Lwaleed BA 1999; Lopez-Pedraza C 2006). Zunehmend wird in klinischen Studien auf die pathophysiologische Bedeutung von TF bei hypertonieassoziierten Erkrankungen hingewiesen (Viera LM 2007; Steffel J 2006; Chu AJ 2006). Dabei wurden neben den thrombotischen Komplikationen auch unbekanntere Funktionen des Proteins nachgewiesen.

Die arterielle Hypertonie und die Arteriosklerose sind verwandte Krankheitsentitäten und ähneln sich hinsichtlich ihrer molekularen Mechanismen. Bei beiden Erkrankungen spielen morphologische und funktionelle Alterationen des Endothels eine zentrale Rolle. Diese Veränderungen entwickeln sich auf dem Boden einer chronischen Entzündungsreaktion, an der Monozyten in jeder Phase beteiligt sind (Ross R 1999; Libby P 2001).

Daten von Thiruvikraman belegen, dass in arteriosklerotischen Plaques eine vermehrte TF Exposition auf Monozyten sowie Endothelzellen stattfindet (Thiruvikraman SV 1996). Dabei ist im Vergleich zu gesunden Probanden die TF-Exposition um das 3- bis 7-fache erhöht (Westmuckett AD 2006). Weiterhin konnte die TF-Expression während der Adhäsion von Monozyten an zytokinstimulierte Endothelzellen induziert werden (Lo SK 1995). Die TF Expression von Monozyten ist ein relevanter Mechanismus in der Hypertonie assoziierten Arteriosklerose.

Arterielle Hypertonie und Arteriosklerose gelten als Risikofaktoren für thrombotische Ereignisse, insbesondere bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (Fadl YY 2003). Als molekulare Ursache der gesteigerten Thromboseneigung konnte eine verstärkte TF-Expression von Monozyten in arteriosklerotisch rupturierten Plaques nachgewiesen werden (Houston DS 2002). Die Aggregation von Plättchen sowie die Formation von Thromben in arteriosklerotischen Plaques stehen in direkter Korrelation zu deren Gehalt an TF (Toschi V 1997). Die Studie von Miller demonstriert, dass bei Hypertonikern eine gesteigerte Gerinnung vorliegt und postuliert eine vermehrte TF-Expression auf Monozyten (Miller MA 1995). Die Ergebnisse der Arbeit unterstützen diese Annahme.

Zunehmend wurden neben seiner koagulatorischen Funktion auch Charakteristika der Adhäsion und Migration entdeckt. Eine gesteigerte Expression des Proteins konnte bei der Untersuchung von Monozyten während ihrer Differenzierung zu Gewebsmakrophagen nachgewiesen werden (Meisel SR 2002). Studien von Randolph ergaben, dass die entgegengesetzte Transmigration von Monozyten durch das Endothel in Abhängigkeit von TF stattfindet und mittels Inhibition durch den TF-Antikörper VIC7 dieser Vorgang unterbunden werden kann (Randolph GJ 1998). TF ist somit für die Adhäsions- und Migrationsprozessen der Monozyten erforderlich.

Ergebnisse von Dörffel dokumentieren bei arterieller Hypertonie eine gesteigerte Adhäsion der Monozyten an Endothelzellen (Dörffel Y 2001). Als mögliche Ursache der gesteigerten

Adhäsion konnte in der vorliegenden Arbeit eine erhöhte TF-Expression nachgewiesen werden.

Die arterielle Hypertonie und die Arteriosklerose sind verwandte Krankheitsentitäten und ähneln sich hinsichtlich ihrer molekularen Mechanismen. Bei beiden Erkrankungen spielen morphologische und funktionelle Alterationen des Endothels eine zentrale Rolle. Diese Veränderungen entwickeln sich auf dem Boden einer chronischen Entzündungsreaktion, an der Monozyten in jeder Phase beteiligt sind (Ross R 1999; Libby P 2001).

Daten von Thiruvikraman belegen, dass in arteriosklerotischen Plaques eine vermehrte TF Exposition auf Monozyten sowie Endothelzellen stattfindet (Thiruvikraman SV 1996). Dabei ist im Vergleich zu gesunden Probanden die TF-Exposition um das 3- bis 7-fache erhöht (Westmuckett AD 2006). Weiterhin konnte die TF-Expression während der Adhäsion von Monozyten an zytokinstimulierte Endothelzellen induziert werden (Lo SK 1995). Die TF Expression von Monozyten ist ein relevanter Mechanismus in der Hypertonie assoziierten Arteriosklerose.

Letztendlich vermittelt der Transkriptionsfaktor NFκB und das Protein AP1 die TF-Gen Aktivierung im Zellkern von Monozyten. NFκB induziert zahlreiche Gene, die für entzündliche Prozesse relevant sind. Hierzu zählen neben Zytokinen und Wachstumsfaktoren auch die Adhäsionsmoleküle VCAM1, ICAM1 und TF. Weiterführende Studien konnten eine erhöhte NFκB Konzentration in Monozyten von Hypertoniepatienten nachweisen.

Da in der vorliegenden Arbeit auch unter den Normalkontrollen eine Expression verzeichnet wurde, kann eine mögliche Voraktivierung der Monozyten während der Probengewinnung letztendlich nicht sicher ausgeschlossen werden. Mit der Wahl der Negativisolierung konnte die Voraktivierung im Vergleich zu bisherigen Isolierungsverfahren (Plastikadhärenz) jedoch deutlich gesenkt werden. Weiterhin waren Einflussfaktoren wie Stress, hormonelle Störungen und Umweltfaktoren nicht eruierbar.

Arteriosklerotische Läsionen beeinflussen die Expression der Adhäsionsmoleküle und des Tissue Factors. Trotz sorgfältiger Anamnese und strengen Ausschlusskriterien wie Myokardinfarkt, Apoplex, Nikotinabusus und oraler Kontrazeption kann die Existenz einer endothelialen Dysfunktion sowie einer arteriosklerotischen Läsion im Initialstadium nicht ausgeschlossen werden.

Das Ergebnis dieser Arbeit steht im Einklang mit den o.a. Studien. Es unterstützt die Hypothese, dass Monozyten vermehrt TF als Zeichen der Voraktivierung exprimieren. Es unterstützt die Hypothese, dass aufgrund der gesteigerten Expression eine erhöhte Endothelzell Adhärenz der Monozyten bei essentieller Hypertonie stattfindet. Weiterhin untermauert das Ergebnis die Annahme einer vermehrten Koagulation bei Hypertonikern.

Es steht jedoch in Diskrepanz zu der Studie von Sardo, in der keine gesteigerte TF-Expression und -Aktivität von Monozyten bei unkomplizierten Hypertoniepatienten nachgewiesen werden konnte.

Als unkomplizierte Hypertonie wurde eine sonografisch ermittelte Intima-Media Dicke der Karotisarterie von $< 1\text{mm}$ definiert (Sardo MA 2006). Die Zellen wurden mittels Plastikadhärenz gewonnen. Anhand von PCR und TF-Aktivitätsbestimmung wurde der TF Gehalt ermittelt. Bei näherer Betrachtung der Studie fallen jedoch bedeutsame Unterschiede im Vergleich zu der vorliegenden Arbeit auf :

- Isolierungsverfahren
 - Voraktivierung
 - Reinheit
- Nachweisverfahren

Ein Isolierungsverfahren ohne Beeinflussung des Expressionsverhaltens ist aktuell nicht verfügbar. Im Ablauf der einzelnen Isolierungsschritte wurde eine Voraktivierung der Zellen beobachtet (Stent G 1997). Besonders das Isolierungsverfahren der Plastikadhärenz führt im Vergleich zur Negativisolierung zu einer 7- bis 8-fach gesteigerten Expression von CD11b und CD54 als Zeichen der Voraktivierung. Somit ist das Expressionsverhalten von Monozyten in Kontroll- und Patientengruppe bereits beeinflusst. Da TF nur von aktivierten Monozyten exprimiert wird (Lo SK 1995), sind die Ergebnisse von Sardo unter Umständen auf isolierungsbedingte Effekte zurückzuführen.

Die Ausbeute und Reinheit der via Plastikadhärenz gewonnenen Zellen ist schwankend. Speziell die Verunreinigung durch polymorphkernige Zellen beeinträchtigt die Aussagekraft der TF Analyse, da die höchsten TF-Konzentrationen in eosinophilen Granulozyten registriert wurden (Moosbauer C 2007).

Als Nachweisverfahren wurde die PCR gewählt und die TF Aktivität anhand von Gerinnungszeiten ermittelt. Im Rahmen der PCR wird TF-RNA nachgewiesen - ob das Protein letzt-

endlich exprimiert wird ist damit nicht belegt. Die TF Aktivitätsbestimmung misst TF assoziierte Phänomene. Dieses Nachweisverfahren erlaubt nur indirekte Rückschlüsse auf das Vorhandensein von TF und vage Vermutungen über dessen Konzentration.

5.6.1 Korrelation der Tissue Factor Expression mit den Einflussfaktoren

Bereits in den 80er Jahren konnte Middeke eine erhöhte Dichte β_2 -adrenerger Rezeptoren auf Monozyten nachweisen, die mit dem mittleren arteriellen Blutdruck korreliert (Middeke M 1984). Bezüglich des systolischen Blutdrucks sind in der Literatur Korrelationen für die Interleukin-1 Sekretion von Angiotensin stimulierten Monozyten (Dörffel Y 1999) beschrieben. Weiterhin korreliert lösliches ICAM1 und IL-6 mit dem Blutdruck. In der vorgelegten Arbeit konnte eine Korrelation zwischen der gesteigerten TF-Expression und der Höhe des systolischen Blutdrucks nachgewiesen werden. Die Daten untermauern eine Hypertonie getriggerte Änderung des Expressionsmuster von Monozyten. Eine Korrelation zwischen diastolischem Blutdruck und TF Expression konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Datenlage bezüglich einer Korrelation zwischen dem Alter und der Expression von Oberflächenmolekülen auf den Zellen des Immunsystems ist gering. Es besteht keine Korrelation für lösliches ICAM1 (De Souza CA 1997) oder für die Interleukinsekretion von Monozyten (Dörffel Y 1999). Die Expression von TF auf Monozyten korreliert ebenfalls nicht mit dem Alter.

Die Ergebnisse unterstützen die These einer Korrelation zwischen Blutdruck und Expression von Oberflächenmolekülen auf Monozyten. Es konnte gezeigt werden, dass die TF-Expression mit dem systolischen Blutdruck korreliert.

5.7 ICAM1-Expression bei Hypertonikern

ICAM1 (CD 54a) hat ein relatives Molekulargewicht von 80-100 kDa (Altmann DM 1989) und besteht aus fünf extrazellulären, einer transmembranären und einer intrazellulären Domäne (Staunton DE 1988). Das für ICAM-1 kodierende Gen besteht aus Exons, wovon das erste für die Signalsequenz, die folgenden für die extrazellulären, transmembranären und

intrazellulären Domänen kodieren (Horley KJ 1989). Beim Menschen befindet sich das ICAM1-Gen auf Chromosom 9.

ICAM1 ist ein Glykoprotein und vorwiegend in die Membran von Endothelzellen aber auch von Monozyten integriert. Es gehört zu der Immunglobulin Superfamilie und erkennt die Integrine B2 α 1 und B2 α 2 auf der Oberfläche von Leukozyten (Briskin MJ 1996). In der Membran mononukleärer Zellen liegt es größtenteils in inaktivem Zustand vor, zeigt jedoch eine vermehrte Aktivierung bei Hypertonie.

Die Migration von Monozyten durch epitheliale Barrieren wird beeinflusst von Zytokinen und ist abhängig von der Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 (Rosseau S 2000). Insbesondere die Zytokine TNF- α und Interleukin 1 sind für eine gesteigerte Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen verantwortlich (Swerlick RA 1992).

ICAM1 fungiert als Ligand für LFA-1 (Leukocyte function associated antigen-1). Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass gegen den Komplex ICAM-1/LFA-1 gerichtete Antikörper zu einer reduzierten Adhärenz von Monozyten an die Intima führten (Watanabe T 1998). Vergleichende Untersuchungen an SHR und Wistar Kyoto Ratten ergaben eine differente ICAM1 Expression. Ursächlich wird dabei auf eine hypertonieassoziierte Entzündungsreaktion verwiesen (Komatsu S 1997). Diese Daten sprechen für eine Hypertonie assoziierte Expression des Adhäsionsmoleküls.

Weitere Studien konnten nachweisen, dass in den Seren von Hypertoniepatienten eine erhöhte Konzentration von löslichem ICAM1, VCAM1 und MCP1 vorkommt (De Souza CA 1997 Madej A 2005). Tierexperimentelle Untersuchungen an Wistar Ratten belegen, dass hoher Blutdruck bei der ICAM1 Expression eine größere Rolle spielt als das zirkulierende RAAS (Wang H 2004). Auf diesen Daten basiert die Hypothese von der Existenz membranständiger Adhäsionsmoleküle auf Monozyten.

Die Adhäsion der Monozyten an Endothelzellen war im Vergleich zu normotensiven Kontrollen deutlich erhöht (Dörffel Y 2001). Die vorliegende Studie untersuchte die ICAM-1 Synthese als Folge der hypertoniebedingten Aktivierung mononukleärer Zellen. Es wurde nachgewiesen, dass Monozyten von Hypertoniepatienten zwar verstärkt ICAM-1 auf ihrer Oberfläche exprimieren - jedoch ohne statistische Signifikanz.

Die Monozyten normotensiver Kontrollen ergaben eine geringere Expression von ICAM-1, die auf die insgesamt reduzierte physiologische Expression des Moleküls zurückgeführt wurde. Allerdings wurden deutliche Expressionsergebnisse in der Patientengruppe

dokumentiert, was letztendlich auf eine hypertonicassozierte Voraktivierung zurückgeführt werden kann. Das Übergewicht lag im Vergleich zwischen den beiden Studiengruppen deutlich auf der Seite der Patientengruppe.

5.8 Tissue Factor Expression nach AT1-AK Stimulation

Interaktionen zwischen dem Immunsystem und der arteriellen Hypertonie sind seit längerer Zeit bekannt. Anfangs wurden erhöhte IgG Serumspiegel registriert. Erst knapp 20 Jahre später begann die Ära der Rezeptor spezifischen Autoantikörper. Fu entdeckte einen agonistischen AT1-AK in Seren von Hypertonikern (Fu ML 2000). In der Studie von Liao wurden Antikörper gegen den AT1-Rezeptor und den α_1 -adrenergen Rezeptor nachgewiesen (Liao YH 2002).

Grundlegende Erkenntnisse lieferten Dechend und Wallukat im Rahmen ihrer Präeklampsie - Studien. Die Erkrankung gilt als Modell für die Hypertonie assoziierten Gefäßwandveränderungen, da sie foudroyant verläuft und innerhalb weniger Wochen zu den bekannten Gefäßwandschäden einer langjährigen Hypertonie führt. Der AT1-AK wurde aus Seren von Präeklampsie Patientinnen isoliert und die Signaltransduktion an glatten Muskelzellen und Trophoblasten untersucht. Die Signaltransduktion verläuft in Abhängigkeit von der Proteinkinase C. Ausgangspunkt ist die spezifische Bindung des AT1-Autoantikörper an den AT1-Rezeptor und die konsekutive Aktivierung des TF-Promoters (Dechend R 2000, Wallukat G 1999).

Da es sich bei dem AT1-AK um eine agonistischen Antikörper handelt stellte sich zunächst die Frage, welche Effekte mittels Angiotensin II Stimulation bei Monozyten provozierbar sind.

Es konnte gezeigt werden, dass AT ein potenter Stimulator der ICAM-1 Expression ist. Nagata demonstrierte, dass AT ein direkter Modulator der TF-Synthese auf Monozyten ist und der Effekt mittels ACE-Hemmer und AT1-Blocker unterbunden werden konnte. Durch Blockade des RAAS wurde gleichzeitig eine Reduktion der TNF α -Synthese erzielt. Daher folgerte Nagata, dass die TF-Regulation durch das RAAS in Abhängigkeit von TNF α vermittelt wird (Nagata K 2001). Diese Folgerung korreliert mit der Studie von Dörffel, in der eine erhöhte TNF- α -Sekretion bei Monozyten hypertensiver Patienten nachgewiesen werden konnte (Dörffel Y 1999).

AT induziert somit bei Monozyten via AT1-Rezeptor Bindung inflammatorische Effekte, die die Entwicklung einer Hypertonie assoziierten Arteriosklerose unterstützen.

Bisher ist nicht bekannt, wie der AT1-AK den AT1-Rezeptor aktivieren, da er nicht die AT-Bindungsstelle erkennt. Die Bindung erfolgt an ein Epitop, das an der zweiten extrazellulären Schleife des AT1-Rezeptors lokalisiert ist (Wallukat G 1999). Da AT1-AK agonistische Effekte hervorrufen, wird vermutet, dass der AT1-AK die agonistische Konformation des AT1-Rezeptors stabilisiert (De Gasparo M 2000).

Wir konnten in Kapitel 4.3 eine gesteigerte TF-Expression bei Hypertonikern nachweisen. Analog zu den Ergebnissen der Präeklampsie Studien ergab sich die Hypothese, dass ein Zusammenhang zwischen der essentiellen Hypertonie und der Artherogenese unter Vermittlung von AT1-AK bestehen könnte. Folglich wurde untersucht, inwieweit die Stimulation mit dem von Präeklampsie Patientinnen gewonnenen AT1-Antikörper die TF-Synthese von Monozyten beeinflusst. Im Detail wurde untersucht, ob die Stimulation eine Steigerung der Expression in der Patientengruppe und insbesondere bei gesunden Normalkontrollen induziert.

Die vorliegende Arbeit belegt, dass eine gesteigerte TF-Expression nach AT1-Antikörper Stimulation bei normotensiven Kontrollen induziert werden konnte. Im Vergleich zwischen normotensiven Kontrollen und Patienten fallen die Stimulationseffekte zugunsten der Hypertoniepatienten aus. Hierbei ist einschränkend zu erwähnen, dass die Hypertoniepatienten ohnehin eine gesteigerte Expression aufweisen.

Die Ergebnisse unterstützen die These, dass agonistische Autoantikörper molekulare Mechanismen im Rahmen der essentiellen Hypertonie induzieren und die Entwicklung arteriosklerotischer Gefäßveränderungen begünstigen.

Einschränkend muss darauf verwiesen werden, dass trotz sorgfältiger Reinigung nicht ausgeschlossen werden kann, inwieweit die Stimulation ausschließlich dem Antikörper zuzuschreiben ist. Schließlich wurde der Antikörper aus einem fremdem Spenderserum gewonnen.

Aktuell existieren keine Daten bezüglich der Konzentration des Antikörpers. Hochgereinigter AT1-AK konnte in deutlich geringerer Konzentration im Vergleich zu ungereinigtem AT1-AK eingesetzt werden.

Die Arbeit konnte ebenfalls nicht klären, inwiefern der Effekt durch spezifische Bindung des Antikörpers an den AT1-Rezeptor und dessen anschließender Aktivierung basiert. In Anlehnung an die Ergebnissen von Wallukat und de Gasparo gehen wir von einer Stabilisierung der agonistischen Konformation des Rezeptors aus.

Zusammenfassend sehen wir in dem AT1-AK einen potenten Stimulator der TF-Expression auf Monozyten. In Übereinstimmung mit den Daten der Präeklampsie Studien gehen wir davon aus, dass agonistische Antikörper zur Entwicklung arteriosklerotischer Läsionen sowie thrombotischer Ereignisse im Rahmen der essentiellen Hypertonie beitragen.

Auch wenn die Antikörper momentan noch eine untergeordnete Rolle im klinischen Alltag spielen, sollte ihre Relevanz nicht unterschätzt werden.

Analog zu der Therapie der dilatativen Kardiomyopathie besteht die Möglichkeit der Immunadsorption und Plasmapherese. Ebenso wäre die Entwicklung spezifischer AT1-Rezeptor Blocker oder eine immunsuppressive Therapie vorstellbar (Homuth V 2001). Der Einsatz von Heparin würde die prokoagulatorischen Effekte unterbinden (Dechend R 2000).

Letztendlich sind AT1-AK ein Indiz für die Komplexität der Hypertonie assoziierten arteriosklerotischen Gefäßwandveränderungen. Es bleibt weiteren Studien vorbehalten, diese immunologische Komponente genauer zu erforschen.

6 Zusammenfassung

HINTERGRUND : Die arterielle Hypertonie ist ein Hauptrisikofaktor hinsichtlich kardiovaskulärer Erkrankungen. Sie korreliert häufig mit Diabetes, Hyperlipoproteinämie und Adipositas. Ihre Progression und Folgeschäden spielen sich meist auf dem Boden einer arteriosklerotisch veränderten Gefäßwand ab.

Dabei ist in erster Linie die endotheliale Dysfunktion als Ausgangspunkt der Artherogenese anzusehen und somit der Focus auf die Endothelzelle gerichtet. Dennoch mehren sich die Anzeichen, dass inflammatorische Prozesse eine immer größere Rolle spielen. Ein Initialschritt ist die Adhäsion von Monozyten an das Gefäßendothel. In den bisherigen Studien konnte eine Voraktivierung der Monozyten bei Hypertonikern nachgewiesen werden. Diese Voraktivierung konnte durch Stimulation mit Angiotensin II und dem AT1-AK in vitro reproduziert werden.

Ziel dieser Arbeit war, die immunpathologischen Mechanismen des Adhäsionsprozesses auf der molekularen Ebene zu untersuchen. Im Brennpunkt der Untersuchung standen Monozyten und deren Expressionsverhalten.

METHODIK : Anfangs wurde ein Isolierungs- und Nachweisverfahren gesucht und entwickelt, das eine schonende und aussagekräftige Untersuchung dieser speziellen Zellpopulation ermöglicht. Anschließend erfolgte der Nachweis des Adhäsionsmoleküls ICAM1 und des Tissue Factor mittels Western Blot. In Anlehnung an die Ergebnisse von Dechend und Wallukat wurden Monozyten mit dem AT1-AK stimuliert und die TF-Expression gemessen.

ERGEBNISSE :

- Monozyten von Hypertoniepatienten exprimieren signifikant erhöhte Level an Tissue Faktor. Die Expression des Moleküls korreliert mit dem systolischen Blutdruck.
- Entsprechend konnte für das Adhäsionsmolekül ICAM1 eine tendenzielle Expressionssteigerung nachgewiesen werden.
- Die Expression von ICAM1 konnte mittels Angiotensin II - und LPS-Stimulation, die Expression von TF mittels AT1-AK Stimulation induziert werden.
- Der AT1-AK ist ein potenter Stimulator der TF-Expression. Die Expression normotensiver Probanden war nach AT1-AK Stimulation signifikant erhöht.

- Monozyten von Hypertoniepatienten weisen eine tendenzielle Steigerung der TF-Expression nach AT1-AK Stimulation auf.

SCHLUSSFOLGERUNG : Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass Monozyten bei Hypertonie ein verändertes Expressionsmuster aufweisen. Diese Tatsache kann den arteriosklerotischen Prozess unterstützen und beschleunigen. Aus unserer Sicht ist die Expression Ausdruck einer gesteigerten Aktivierung der Zellen und erklärt ihre erhöhte Adhärenz an Endothelzellen. Entsprechende Expressionslevel ließen sich durch Stimulation mit Angiotensin, LPS und dem AT1-AK bei normotensiven Probanden provozieren.

Die Absicht der vorgelegten Arbeit ist, einen Beitrag zum Verständnis der immunologischen Komponente der arteriellen Hypertonie zu leisten.

7 Literaturverzeichnis

1. Albrecht S, Luther T, Großmann H, Flössel C, Kotzsch M, Müller M : An ELISA for tissue factor using monoclonal antibody. *Blood Coagul Fibrinol.* 1992; 3 : 263-270
2. Albrecht S, Kotzsch M, Siegert G, Luther T, Großmann H, Großer M, Müller M : Detection of circulating tissue factor and factor VII in a normal population. *Thromb Haemost.* 1996; 75 : 772-777
3. Al-Saady-NM, Leatham-EW, Gupta S, Kwan JTC, Eastwood JB, Seymour CA : Monocyte expression of tissue factor and adhesion molecules : the link with accelerated coronary artery disease in patients with chronic renal failure. *Heart* 1999; 81 : 134-140
4. Altmann DM, Hogg N, Trowsdale J, Wilkinson D : Cotransfection of ICAM-1 and HLA-DR reconstitutes human antigen-presenting function in mouse L cells. *Nature* 1989; 338 : 512
5. Andrioli G, Ortolani R, Fontana L, Gaino S, Bellavite P, Lechi C, Minuz P, Manzato F, Tridente G, Lechi A : Study of platelet adhesion in patients with uncomplicated hypertension. *Journal of Hypertension* 1996; 14 : 1215-1221
6. Arnaud C, Mach F : Pleiotropic effects of statins in atherosclerosis: role on endothelial function, inflammation and immunomodulation. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2005; 98 : 661-666
7. Bataillard A, Vincent M, Sassard J, Touraine JL : Antihypertensive effect of an immunosuppressive agent, cyclophosphamide, in genetically hypertensive rats of Lyon strain. *Int J Immupharmacol.* 1989; 124 : 132-138
8. Blake GJ, Ridker PM : Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction. *J Intern Med.* 2002; 252 : 283–294.

9. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D : Activated transcription factor nuclear factor kappaB is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest.* 1996; 97 : 1715-1722
10. Briskin MJ, Rott L, Butcher EC : Structural requirements for mucosal vascular addressin binding to its lymphocyte receptor alpha 4 beta 7. Common themes among integrin-Ig family interactions. *J Immunol.* 1996; 156 : 719-726
11. Buchs AE, Kornberg A, Zahavi M, Aharoni D, Farfati C, Rapoport MJ : Increased expression of tissue factor and receptor for advanced glycation end products in peripheral blood mononuclear cells of patients with type 2 diabetes mellitus with vascular complications. *Exp. Diabesity Res.* 2004; 5 : 163-169
12. Butenas S, Bouchard BA, Brummel-Ziedins KE, Parhami-Seren B, Mann KG : Tissue factor in whole blood. *Blood* 2005; 105(7) : 2764-2770
13. Carrey RM, Wang ZQ, Siragy HM: Role of the angiotensin type II receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension* 2000; 35 : 155-163
14. Chu AJ : Tissue factor upregulation drives a thrombosis-inflammation circuit in relation to cardiovascular complications. *Cell Biochem Funct.* 2006; 24(2) : 173-192
15. Cigola E, Kajstura J, Li B, Meggs LG, Anversa P : Angiotensin II activates programmed myocyte cell death in vitro. *Exp Cell Res* 1997; 231 : 363-371
16. Clozel M, Kuhn H, Hefti F, Baumgartner HR : Endothelial dysfunction and sub-endothelial monocyte macrophages in hypertension. *Hypertension* 1991; 18 : 131-134
17. Collins T : Endothelial nuclear factor kappa b and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest.* 1993; 68(5) : 499-508
18. Cominacini L, Pasini AF, Garbin U, Evangelista S, Crea AEG, Tagliacozzi D, Nava C, Davoli A, LoCascio V : Zofenopril inhibits the expression of adhesion molecules on

- endothelial cells by reducing reactive oxygen species. *Am J Hypertension* 2002; 10 : 891-895
19. Cominelli F, Dinarello CA : Interleukin-1 in the pathogenesis of and protection from inflammatory bowel disease. *Biotherapy*. 1989; 1 : 369-375
 20. Crutschley DJ, Conanan LB, Que BG : K-Channel blockers inhibit Tissue factor expression by human monocytic cells. *Circ Res*. 1995; 76 : 16-20
 21. Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr : Endothelial expression of mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991; 251 : 788-791
 22. Daemen MJ, Lo DM, Bosman FT, Schwartz SM. Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ Res*. 1991; 68: 450-456
 23. Dechend R, Homuht V, Wallukat G, Kreuzer J, Park JK, Theuer J, Juepner A, Gulba DC, Mackman N, Haller H, Luft FC. AT1 receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients cause vascular cells to express tissue factor. *Circulation* 2000; 1001(20) : 2382-2387
 24. Dechend R, Müller DN, Wallukat G, Homuth V, Krause M, Dudenhausen J, Luft FC : Activating auto-antibodies against the AT1 receptor in preeclampsia. *Autoimmun Rev*. 2005; 4 (1) : 61-65
 25. Dechend R, Homuth V, Wallukat G, Müller DN, Krause M, Dudenhausen J, Haller H, Luft FC : Agonistic antibodies directed at the angiotensin II, AT1 receptor in preeclampsia. *Soc Gynecol Investig*. 2006; 13 (2) : 79-86
 26. De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright W, Unger T : International Union of Pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*. 2000; 52 : 415-472

27. De Gasparo M, Siragy HM : The AT2 Receptor : fact, fancy and fantasy. Regul Pept. 1999; 81 : 11-24
28. De Souza CA, Dengel DR, Macko RF, Cox K, Seals DR : Elevated levels of circulating cell adhesion molecules in uncomplicated essential hypertension. AJH 1997; 10 : 1335-1341
29. Dielis AW, Smid M, Spronk HM, Hamulyak K, Kroon AA, Cate H, de Leeuw PW : The prothrombotic paradox of hypertension : role of the renin-angiotensin and kallikrein-kinin systems. Hypertension 2005; 46 : 1236-1242
30. Diez J : Review of the molecular pharmacology of Losartan and its possible relevance to stroke prevention in patients with hypertension. Clin Ther. 2006; 28 : 832-848
31. Dinarello CA : Biological basis for interleukin-1 in disease. Blood 1996; 87 : 2095-2147
32. Dörffel Y, Lätsch C, Stuhlmüller B, Schreiber S, Scholze S, Burmester GR, Scholze J: Preactivated peripheral blood monocytes in patients with essential hypertension. Hypertension 1999; 34 : 113-117
33. Dörffel Y, Franz S, Pruß A, Neumann G, Rohde W, Burmester GR, Scholze J: Preactivated monocytes from hypertensive patients as a factor for atherosclerosis ? Atherosclerosis 2001; 157 : 151-160
34. Dörffel Y, Wallukat G, Bochnig N, Homuth V, Herberg M, Dörffel W, Pruss A, Chaoui R, Scholze J : Agonistic AT1 receptor autoantibodies and monocyte stimulation in hypertensive patients. AJH 2003; 16 : 827-833
35. Fadl YY, Zareba W, Moss AJ, Marder VJ, Sparks CS, Miller Watelet LF, Carrol ER : History of hypertension and enhanced thrombogenic activity in postinfarction patients. Hypertension 2003; 41(4) : 943-949

36. Fagiotto A., Ross R., Harker L : Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. Changes that lead to fatty streakformation. *Arteriosclerosis* 1984; 4 : 323-340
37. Ferro D, Parrotto S, Basili S, Alessandri C, Violi F : Simvastation inhibits the monocyte expression of proinflammatory cytokines in patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 36 : 427-431
38. Fu ML, Herlitz H, Schulze W, Wallukat G, Micke P, Eftekhari P, Sjögren KG, Hjalmarson A, Müller-Esterl W, Hoebeke J : Autoantibodies against the angiotensin receptor (AT1) in patients with hypertension. *J Hypertens* 2000; 18 : 945-953
39. Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia : autocrin transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest.* 1992; 90 : 456-461
40. Gimbrone MA, Jr, Bevilacqua MP, Cybulsky MI : Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte adhesion inflammation and atherosclerosis. *Ann Ny Acad Sci.* 1990; 598 : 77-85
41. Gupta S, Young D, Sen S : Inhibition of NF-kappaB induces regression of cardiac hypertrophy, independent of blood pressure control, in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 289 : 20-29
42. Hahn AW, Jonas U, Buhler FR, Resink TJ : Activation of human peripheral monocytes by angiotensin II. *FEBS lett.* 1994; 347:178-180
43. He M, He X, Xie Q, Chen F, He S : Angiotensin II induces the expression of tissue factor and its mechanism in human monocytes. *Throm Res.* 2006; 117(5) : 579-590
44. Hölschermann H, Terhalle H-M, Zakel U, Maus U, Parviz B, Tillmanns H, Haberbosch W : Monocyte tissue factor expression is enhanced in women who smoke and use oral contraceptives. *Thromb Haemost.* 1999; 82 : 1614-1620.

45. Holtzhauer M, Biochemische Labormethoden. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 1995, 2. Auflage
46. Homuth V, Dechend R : Autoantikörper gegen den Angiotensin AT1-Rezeptor sind im Tiermodell einer malignen Hypertonie am kardiovaskulären Endorganschaden beteiligt. Thieme Verlag ZGN 2001
47. Horley KJ, Carpenito C, Baker B, Takei F : Molecular cloning of murine intercellular adhesion molecule (ICAM-1). EMBO J. 1989; 8 : 2889-2896
48. Houston DS : Tissue factor – a therapeutic target for thrombotic disorders. Expert Opin Ther Targets 2002; 6(2) : 159-174
49. Hunyady L, Catt KJ : Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. Mol Endocrinol. 2006; 20(5) : 953-970
50. Inoue J, Gohda J, Akiyama T, Semba K : NF-kappaB activation in development and progression of cancer. Cancer Sci. 2007; 98 : 268-274
51. Ishikawa J, Tamura Y, Hoshida S, Eguchi K, Ishikawa S, Shimada K, Kario K : Low-grade inflammation is a risk factor for clinical stroke events in addition to silent cerebral infarcts in Japanese older hypertensives : the Jichi Medical School ABPM Study, wave 1. Stroke 2007; 38 : 911-917
52. Kadar A, Glasz T: Development of atherosclerosis and plaque biology. Cardiovascular Surg. 2001; 9(2) : 109-121
53. Kannel WB : Hypertension as a risk factor for cardiac events-epidemiologic results of long-term studies. J Cardiovasc Pharmacol. 1993; 21 : S27-S37
54. Kannel WB, Neaton JD, Wentworth D, Thomas HE, Stamler J, Hulley SB, Kjelsberg MO : Overall and coronary heart disease mortality rates in relation to major risk factors

- in 325, 348 men screened for MRFIT : Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am Heart J.* 1986; 112 : 825-836
55. Keidar S. Angiotensin, LDL, peroxidation and arteriosclerosis. *Life Sci.* 1998; 63 : 1-11
 56. Kensuke E. Clinical Importance of endothelial function in arteriosclerosis and ischemic heart disease. *Circ.* 2002; 66 : 529-533
 57. Kim JA, Berliner JA, Nadler JL : Angiotensin II increases monocyte binding to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 226(3) : 862-868
 58. Kjeldsen SE, Farsang C, Sleigh P, Mancia G. 1999 WHO/ISH hypertension guidelines-highlights and fresh update. *J Hypertension* 2001; 19(12) : 2285-2288
 59. König W, Marx N : Artherothrombotische Komplikationen – Warum Diabetiker besonders stark gefährdet sind. *Cardiovasc.* 2001; 1 : 34-36
 60. Komatsu S, Panes J, Russell JM, Anderson DC, Muzykantov VR, Miyasaka M, Granger ND : Effects of chronic arterial hypertension on constitutive and induced intercellular adhesion molecule 1 expression in vivo. *Hypertension* 1997; 29 : 683-689
 61. Kranzhofer R, Browatzki M, Schmidt J, Kubler W : Angiotensin II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor-kappaB in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 257 : 826-828
 62. Krieglstein CF, Granger DN: Adhesion Molecules and their role in vascular disease. *AJH* 2001; 14 : 44S-54S
 63. Kristensen BO: Increased serum levels of immunoglobulins in untreated and treated essential hypertension. *Acta Med Scand.* 1978; 203 : 49-54
 64. Kristensen BO, Andersen PL : Autoantibodies in untreated and treated essential hypertension *Acta Med Scand.* 1978; 203 : 55-59

65. Laemmli UK, : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227 : 680-685
66. Liao YH, Wei YM, Wang M, Yuan HT, Cheng LX : Autoantibodies against AT1-receptor and alpha1-adrenergic receptor in patients with hypertension. *Hypertension Res.* 2002; 25(4) : 641-646
67. Libby P : What have we learned about the biology of atherosclerosis ? The role of inflammation. *Am J Cardiol.* 2001; 88 : 3J-6J
68. Littler AJ, Buckley CD, Wordsworth P, Collins I, Martinson J, Simmons DL : A distinct profile of six soluble adhesion molecules in rheumatoid arthritis. *British Journal of Rheumatology* 1997; 36 : 164-169
69. Lo Siu K, Cheung A, Zheng Q, Roy L. Silverstein : Induction of tissue factor on monocytes by adhesion to endothelial cells. *J Immunol.* 1995; 154 : 4768-4777
70. Lopez-Pedraza C, Buendia P, Cuadrado MJ, Siendones E, Aquirre MA, Barbarroja N, Montiel-Duarte C, Torres A, Khamashhta M, Velasco F : Antiphospholipid antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome induce monocyte tissue factor expression through the simultaneous activation of NF-kappaB/Rel proteins via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, and of the MEK-1/ERK pathway. *Arthritis Rheum.* 2006; 54(1) : 301-311
71. Lüscher TF : Hypertonie und Gefäßerkrankungen : molekulare und zelluläre Mechanismen. *Schweiz Med Wochenschr.* 1995; 125 : 270-282
72. Luft FC : Angiotensin, inflammation, hypertension and cardiovascular disease. *Curr Hypertension Rep.* 2001;3(1) : 61-67
73. Luther HP, Homuth V, Wallukat G : α_1 -adrenergic receptor antibodies in patients with primary hypertension. *Hypertension* 1997; 29 : 678-682

74. Lwaleed BA, Chisholm M, Francis JL : The significance of measuring monocyte tissue factor activity in patients with breast and colorectal cancer. *Br J Cancer* 1999; 80(1-2) : 279-285
75. MacFarlane RG : An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature* 1964; 202 : 498-499
76. Mackman N : Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis and vasclular development. *Arterioscler Thromb Vsc Biol.* 2004; 24(6) : 1015-1022
77. Mackman N : Role of tissue factor in hemostasis and thrombosis. *Blood Cells Mol Dis.* 2006; 36 : 104-107
78. Madej A, Okopien B, Kowalski J, Haberka M, Herman ZS : Plasma concentrations of adhesion molecules and chemokines in patients with essential hypertension. *Pharmacol Rep.* 2005; 57(6) : 878-81
79. Malarstiq A, Tenno T, Johnston N, Lagerqvist B, Axelsson T, Syvanen AC, Wallentin L, Siegbahn A : Genetic variations in the tissue factor gene are associated with clinical outcome in acute coronary syndrome and expression levels in human monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 35 : 2667-2672
80. Mandal SK, Pendurthi UR, Rao LV : Cellular localization and trafficking of tissue factor. *Blood* 2006; 107 : 4746-4753
81. McCarron RM, Wang L, Siren AL, Spatz M, Hallenbeck JM : Monocyte adhesion to cerebromicrovascular endothelial cells derived from hypertensive and normotensive rats. *Am J Physiol.* 1994; 267 : H2491-H2497
82. Meisel SR, Xu XP, Edgington TS, Dimayuga P, Kaul S, Lee S, Fishbei MC, Cercek B, Shah PK : Differentiation of adherent monocytes into macrophages markedly enhances tissue factor protein expression and procoagulant activity. *Atherosclerosis* 2002; 161 : 35-43

83. Menzel EJ, Burtscher H, Kolarz G : Inhibition of cytokine production and adhesion molecule expression by ibuprofen is without effect on transendothelial migration of monocytes. *Inflammation* 1999; 23 : 275-286
84. Middeke M, Remien J, Holzgreve H : The influence of sex, age, blood pressure and physical stress on beta 2-adrenoceptor density of mononuclear cells. *J Hypertension* 1984; 2 : 261-164
85. Miller MA, Spillert CR, Ponnudurai R, Bonthu S, Lazaro EJ: Are hypertensives hypercoagable ? *J Natl Med Assoc.* 1995; 87 : 71-72
86. Mills PJ, Farag NH, Perez C, Dimsdale JE : Peripheral blood mononuclear cell CD62L and CD11a expression and soluble interstitial cell adhesion molecule-1 levels following infused isoproterenol in hypertension. *J Hypertension* 2002; 20(2) : 311-316
87. Moons AH, Levi M, Peters RJ : Tissue factor and coronar artery disease. *Cardiovasc Res.* 2002; 53(2) : 313-325
88. Moosbauer C, Morgenstern E, Cuvelier SL, Manukyan D, Bidzhekov K, Albrecht S, Lohse P, Patel KD, Engelmann B : Eosinophils are a major intravascular location for tissue factor storage and exposure. *Blood* 2007; 109(3) : 995-1002
89. Müller D, Mervaala MA, Schmidt F, Park JK, Dechend R, Genersch E, Breu V, Löffler BM, Ganten D, Schneider W, Haller H, Luft FC : Effect of bosentan on NF κ B, inflammation and Tissue Factor in angiotensin II induced end organ damage. *J Hypertension* 2000; 36(2) : 282-290
90. Müller D, Mervaala EM, Dechend R, Fiebeler A, Park JK, Schmidt F, Theuer J, Breu V, Mackman N, Luther T, Schneider W, Gulba D, Ganten D, Haller H, Luft FC : Angiotensin II (AT(1)) receptor blockade reduces vascular tissue factor in angiotensin II-induced cardiac vasculopathy. *Am J Pathol.* 2000; 157 : 111-122
91. Müller J, Rox JM, Pötzsch B : Tissue Factor Gene Expression Analysis in Circulating Monocytes. *Transfus Med Hemother* 2006; 33 : 183-188

92. Nagata K, Ishibashi T, Sakamoto T, Nakazato K, Seino Y, Yokoyama K, Ohkawara H, Teramoto T, Maruyama Y : Effects of blockade of the renin-angiotensin system on tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 synthesis in human cultured monocytes. *J Hypertension* 2001; 19 : 776-789
93. Napoleone E, Di Santo A, Camera M, Tremoli E, Lorenzet R : Angiotensin-converting enzyme inhibitors downregulate tissue factor synthesis in monocytes. *Circ Res.* 2000; 86 : 139-149
94. Nataraj C, Oliverio MI, Mannon RB, Mannon PJ, Audoly LP, Amuchastegui CS, Ruiz P, Smithies O, Coffman TM : Angiotensin II regulates cellular immune responses through a calcineurin-dependent pathway. *J Clin Invest.* 1999; 104 : 1693-1701
95. National Institutes of Health. The sixth report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation and treatment of high blood pressure. *Arch Intern Med.* 1997; 157(21) : 2413-2446.
96. Neutel JM : Beyond the sphygmomanometric numbers : Hypertension as a syndrome. *A JH* 2001; 14 : 250-257
97. Nishimura H, Tsuji H, Masuda H, Nakagawa K, Nakahara Y, Kitamura H, Kasahara T, Sugano T, Yoshizumi M, Sawada S, Nakagawa M : Angiotensin II increases plasminogen activator inhibitor-1 and tissue factor mRNA expression without changing that of tissue type plasminogen activator or tissue factor pathway inhibitor in cultured rat aortic endothelial cells. *Thromb Haemost.* 1997; 77 : 1189-1195
98. Ohki R, Yamamoto K, Mano H, Lee RT, Ikeda U, Shimada K : Identification of mechanically induced genes in human monocytic cells by DNA microarrays. *J Hypertension* 2002; 20(4) : 685-691
99. Ohsawa M, Koyama T, Nara N, Hirosawa S : Induction of tissue factor expression in human monocytic cells by protease inhibitors through activating activator protein-1 (AP-1) with phosphorylation of Jun-N-terminal kinase and p38. *Thromb Res.* 2003; 112 : 313-320

100. Osterud B : Tissue factor expression by Monocytes : Regulation and pathophysiological roles. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; (1) : S9-S14
101. Osterud B, Bjorklid E : Sources of tissue factor. *Semin Thromb Hemost.* 2006; 32(1) : 11-23
102. Ott I, Fischer E, Miyagi Y, Müller BM, Ruf W : A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280. *J Cell Biol.* 1998; 140 : 1214-1253
103. Parissis JT, Korovesis S, Giazitzoglou E, Kalivas P, Katritsis D : Plasma profiles of peripheral monocyte-related inflammation markers in patients with arterial hypertension. Correlation with plasma endothelin-1. *Int J Cardiol.* 2002; 83 : 13-21
104. Randolph GJ, Luther T, Albrecht S, Magdolen V, Muller WA : Role of tissue factor in adhesion of mononuclear phagocytes to and trafficking through endothelium in vitro. *Blood* 1998; 92 : 4167-4177
105. Reinhardt C : New locations of intravascular tissue factor : indications. *Hämostasologie* 2007; 27(1) : 55-58
106. Riou S, Mees B, Esposito B, Merval R, Vilar J, Stengen D, Ninio E, van Haperen R, de Crom R, Tedgui A, Lehoux S : High Pressure Promotes Monocyte Adhesion to the Vascular Wall. *Circ Res.* 2007;
107. Roitt I, Brostoff J, Male D : *Immunology* Mosby Verlag London 1998
108. Ross R : Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N England J Med.* 1999; 340 : 115-126
109. Rosseau S, Selhorst J, Wiechmann K, Leisner K, Maus U, Mayer K, Grimminger F, Seeger W, Lohmeyer J : Monocyte migration through the alveolar epithelial Barrier : Adhesion molecule mechanisms and impact of chemokines. *J Immunol.* 2000; 164 : 427-435

110. Rubio MA, Sotillos M, Jochems G, Alvarez V, Corbi AL : Monocyte activation : rapid induction of $\alpha 1/\beta 2$ (VLA-1) integrin expression by lipopolysaccharide and interferon γ . *Eur J Immunol.* 1995; 25 : 2701-2705
111. Sakamoto H, Aikawa M, Hill CC, Weiss D, Taylor WR, Libby P, Lee RT : Biomechanical strain induces class a scavenger receptor expression in human monocyte/macrophages and TPH-1 cells : a potential mechanism of increased atherosclerosis in hypertension. *Circulation* 2001; 104(1) : 109-114
112. Sanz-Rosa D, Oubina MP, Cediél E, de Las Heras N, Vegazo O, Jimenez J, Lahera V, Cachofeiro V : Effect of AT1 receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR : role of NF-kappaB/IkappaB system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 288 : 111-115
113. Sardo MA, Campo S, Castaldo M, Bonaiuto A, Bitto A, Saitta C, Cristadoro S, Trimarchi G, Saitta A : Tissue factor expression and activity are not increased in peripheral monocytes isolated from uncomplicated hypertensive patients. *Journal of Hypertension* 2006; 24 : 731-736
114. Schillaci G, Pirro M, Pucci G, Ronti T, Vaudo G, Mannarino MR, Porcellati C, Mannarino E : Prognostic value of elevated white blood cell count in hypertension. *AJH* 2007; 20 : 364-369
115. Schmid-Schönbein GW, Seffge D, DeLano FA, Shen K, Zweifach BW. Leucocyte counts and activation in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Hypertension* 1991; 17 : 323-330
116. Schneider CA : Kardiovaskuläre Risikofaktoren und deren therapeutische Beeinflussung. *Klinischen Kardiologie* 6. Auflage, 2006 : 1-23
117. Scholze J (Hrsg) Hypertonie, Risikokonstellationen und Begleiterkrankungen. Praxisnahe Diagnostik und Individualtherapie. Blackwell Wissenschaftsverlag Berlin, Wien 1999, 2. Auflage

118. Shen K, De Lano FA, Zweifach BW, Schmid-Schönbein GW : Circulating leukocyte counts, activation and degranulation in Dahl hypertensive rats. *Circ Res.* 1995; 76 : 276-283
119. Simon A, Levenson J: Stratification of vascular risk in hypertension and therapeutic perspective. *AJH* 1995; 8 : 45S-48S
120. Staunton DE, Marlin SD, Stratowa C, Dustin ML : Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell* 1988; 52 : 925
121. Steffel J, Luscher TF, Tanner FC : Tissue factor in cardiovascular diseases : molecular mechanisms and clinical implications. *Circulation* 2006; 113(5) : 722-731
122. Stent G, Crowe SM : Effects of monocyte purification and culture on integrin expression. *APMIS* 1997; 105 : 663-670
123. Swerlick RA, Lee KH, Li L-J, Sepp NT, Caugham SW, Lawley TJ : Regulation of vascular cell adhesion molecule 1 on human dermal microvascular endothelial cells. *J Immunol.* 1992; 149 : 698-705
124. Takenaka H, Kihara Y, Iwanaga Y, Onozawa Y, Toyokuni S, Kita T : Angiotensin II, oxidative stress, and extracellular matrix degradation during transition to LV failure in rats with hypertension. *J Mol Cell Cardiol.* 2006; 41 : 989-997
125. Thiruvikraman SV, Guha A, Roboz J, Taubman MB, Nemerson Y, Fallon JT : In situ localization of tissue factor in human atherosclerotic plaques by binding of digoxigenin-labeled factors VIIa and X. *Lab Invest.* 1996; 75(4) : 451-461
126. Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz SD, Fernandez-Ortiz A, Chesebro JH, Badimon L, Nemerson Y, Fuster V, Badimon JJ : Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1997; 95 : 594-599

127. Unger T, Chung O, Csikos T, Culman J, Gallinat S, Gohlke P, Hohle S, Meffert S, Stoll M, Stroht U, Zhu YZ. Angiotensin receptors. *J Hypertens Suppl.* 1996; 14(5) : 59-103
128. Unger T : The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2002; 89(2A) : 3-9
129. Valtier D, Guicheney P, Banduin-Legros M, Meyer P : Platelets in human essential hypertension : in vitro hyperreactivity to thrombin. *Journal of Hypertension* 1986; 4 : 551-555
130. Vieira LM, Dusse LM, Fernandes AP, Martins-Filho OA, de Bastos M, Ferreira MF, Cooper AJ, Lwaleed BA, Carvalho MG : Monocytes and plasma tissue factor levels in normal individuals and patients with deep venous thrombosis of the lower limbs : potential diagnostic tools ? *Throm Res.* 2007; 119 : 157-165
131. Violi F, Criqui M, Longoni A, Castiglioni C, the A.D.E.P. Group : Relation between risk factors and cardiovascular complications in patients with peripheral vascular disease. Results from the A.D.E.P. study. *Atherosclerosis* 1996; 120 : 25-35
132. Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jüpner A, Baur E, Nissen E, Vetter K, Neichel D, Dudenhausen JW, Haller H, Luft FC : Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest.* 1999; 103 : 945-952
133. Wang H, Nawata J, Kakudo N, Sugimura K, Suzuki J, Sakuma M, Ikeda J, Shirato K : The upregulation of ICAM-1 and P-selectin requires high blood pressure but not circulating renin-angiotensin system in vivo. *J Hypertension* 2004; 22(7) : 1323-1332
134. Watanabe T, Fan J : Atherosclerosis and inflammation mononuclear cell recruitment and adhesion molecules with reference to the implication of ICAM-1/LFA-1 pathways in atherogenesis. *Int J Cardiology* 1998; 66 : 45-53

135. Westmuckett AD, Lupu C, Goulding DA, Das S, Kakkar VV, Lupu F : In situ analysis of tissue factor-dependent thrombin generation in human atherosclerotic vessels. *Thromb Haemost.* 2006; 84(5) : 904-911
136. Wierzbicki AS, Poston R, Ferro A : The lipid and non-lipid effects of statins. *Pharmacol Ther.* 2003; 99 : 95-112
137. Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D : Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86(8) : 2839-2843
138. Williams JC, Fortherby MD, Forster LA, Tull SP, Ferns GAA : Mononuclear cell adhesion to collagen ex vivo is related to pulse pressure in elderly subjects. *Atherosclerosis* 2000; 151 : 463-469
139. Wolberg AS, Roubey RA : Mechanisms of autoantibody-induced monocyte tissue factor expression. *Thromb Res.* 2004; 114 : 391-396
140. Xia Y, Wen H, Bobst S, Day MC, Kellems RE : Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human trophoblast cells. *J Soc Gynecol Investig.* 2003; 10(2) : 82-93

8 Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Scholze für die Überlassung dieses Themas bedanken. Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Fr. PD Dr. Yvonne Dörffel, Herrn Dr. Dörffel, Herrn Dr. Gerd Wallukat und seinen Mitarbeitern. Ganz herzlich möchte ich mich auch für die Unterstützung des Teams der kardio-immunologischen Abteilung des Max Delbrück Zentrums Buch bedanken.

9 Erklärung an Eides statt

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation mit dem Titel „Tissue Factor Expression von Monozyten bei essentieller Hypertonie und nach Stimulation mit dem AT1-AK“ von mir selbst und ohne fremde Mithilfe verfasst wurde. Die benutzten Hilfsmittel und Literaturbelege sind vollständig angegeben.