

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Medizinische Klinik und Poliklinik D

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann-Joseph Pavenstädt –

**Expression von Tissue factor in Monozyten
unter Einfluss von Rapamycin**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Sackarnd, Jan

aus Münster (Westf.)

2005

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Heribert Jürgens

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Detlef Lang

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Heidenreich

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2005

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik D

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann-Joseph Pavenstädt –

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Detlef Lang

Koreferent: Prof. Dr. med. Stefan Heidenreich

ZUSAMMENFASSUNG

Expression von Tissue factor in Monozyten unter Einfluss von Rapamycin

Sackarnd, Jan

Nach einer Organtransplantation gilt es, eine Abstoßung des Transplantats durch den neuen Wirt zu verhindern. Hierzu werden u.a. Immunsuppressiva wie z.B. Rapamycin eingesetzt. Fallberichten zufolge kommt es unter Einsatz von Rapamycin immer wieder zu thrombotischen Komplikationen, die zum Organverlust führen können.

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass humane Monozyten in-vitro unter dem Einfluss von Rapamycin konzentrationsabhängig Tissue factor (TF) exprimieren. Da TF der Hauptinitiator der extrinsischen Gerinnungskaskade ist, führt dies zu einer Zunahme der prokoagulatorischen Aktivität der Monozyten. Eine Therapie mit Rapamycin kann einen Risikofaktor für thrombotische Komplikationen darstellen.

Die durch Rapamycin induzierte Zunahme der TF-Expression in Monozyten hat vermutlich primär in entzündlicher Umgebung klinische Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass das antiinflammatorische Interleukin IL-4 zu einer Suppression von TF in Monozyten führt.

In die intrazelluläre Signalkaskade ist die Proteinkinase C (PKC) involviert. Dies konnte mittels des selektiven PKC-Inhibitors Calphostin nachgewiesen werden. Nach Einsatz von Calphostin kam es zu keiner Veränderung der TF-Konzentration im Vergleich zur basalen Expression, trotz Einfluss von Rapamycin.

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2005

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 7 |
| 1.1 | Fragestellung | 9 |
| 2 | GRUNDLAGEN | 10 |
| 2.1 | Tissue factor | 10 |
| 2.1.1 | Aufbau | 10 |
| 2.1.2 | Vorkommen | 11 |
| 2.1.3 | Funktion..... | 11 |
| 2.1.4 | Regulierung der TF-Expression in Monozyten..... | 13 |
| 2.2 | Rapamycin..... | 14 |
| 2.2.1 | Chemische Struktur | 14 |
| 2.2.2 | Wirkung | 15 |
| 2.2.3 | Pharmakologische Daten..... | 17 |
| 2.2.4 | Einsatzgebiete..... | 18 |
| 3 | MATERIAL UND METHODEN | 20 |
| 3.1 | Reagenzien..... | 20 |
| 3.2 | Arbeitsmaterialien..... | 23 |
| 3.3 | Geräte..... | 24 |
| 3.4 | Zellpräparation | 25 |
| 3.4.1 | Separation der Monozyten..... | 25 |
| 3.4.2 | Stimulation der Monozyten | 26 |
| 3.5 | Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) | 27 |
| 3.5.1 | Prinzip der PCR | 27 |
| 3.5.2 | RNA-Präparation..... | 28 |
| 3.5.3 | Umschreibung der mRNA auf cDNA | 29 |
| 3.5.4 | PCR..... | 30 |
| 3.5.5 | Gelelektrophorese | 31 |
| 3.5.6 | Auswertungsprinzip der PCR | 32 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.6 | Durchflusszytometrie (FACS-Analyse / FACScan)..... | 33 |
| 3.6.1 | Prinzip der FACS-Analyse | 33 |
| 3.6.2 | Markierung der Zielmoleküle für die FACS-Analyse | 34 |
| 3.6.3 | Auswertungsprinzip der FACS-Analyse | 35 |
| 3.7 | Aktivitätsmessung..... | 37 |
| 3.7.1 | Prinzip der Aktivitätsmessung..... | 37 |
| 3.7.2 | Präparation zur Aktivitätsmessung | 37 |
| 3.7.3 | Auswertungsprinzip der Aktivitätsmessung..... | 38 |
| 4 | ERGEBNISSE | 39 |
| 4.1 | TF-mRNA-Expression unter Einfluss von Rapamycin | 39 |
| 4.2 | TF-Proteinkonzentration unter Einfluss von Rapamycin | 41 |
| 4.3 | Aktivität von TF unter Einfluss von Rapamycin | 43 |
| 4.4 | TF-mRNA-Expression unter Einfluss von IL-4 | 45 |
| 4.5 | TF-Proteinkonzentration unter Einfluss von IL-4 | 47 |
| 4.6 | Aktivität von TF unter Einfluss von IL-4 | 49 |
| 4.7 | TF-mRNA-Expression unter Einfluss von Calphostin..... | 50 |
| 4.8 | TF-mRNA-Expression unter Einfluss von DOG | 51 |
| 4.9 | Ergebniszusammenfassung..... | 53 |
| 5 | DISKUSSION | 54 |
| 5.1 | Schlussbetrachtung | 63 |
| 6 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | 64 |
| 7 | LITERATURVERZEICHNIS | 67 |
| 8 | LEBENS LAUF | 81 |
| 9 | DANKSAGUNG..... | 82 |

1 Einleitung

In Deutschland wurden im Jahr 2001 laut Statistik 2346 Nieren transplantiert. Nach CTS-Studie (collaborative transplant study) betragen im Zeitraum von 1985 bis 2000 in Deutschland die 5-Jahres-Transplantatfunktionsraten etwa 80 % bei Lebendspenden und ca. 66 % nach Transplantation von Nieren verstorbener Spender.

Vielfältige Ursachen für akute oder chronische Abstoßungsreaktionen sind bekannt oder werden diskutiert. Unzureichende HLA-Kompatibilität [68], Spenderalter über 45 bzw. Empfängeralter unter 40 Jahre [10;22], Todspender [63], lange Ischämiezeit, rechte Spenderniere, Transplantationsort, männliches Geschlecht, Vorerkrankungen bzw. Rückkehr der Grunderkrankung u.v.m. Einen wichtigen Einfluss haben auch thrombotische Ereignisse wie z.B. eine Nierenvenenthrombose. Diese tritt je nach Studie in 0,5% – 7% der Fälle auf, meist innerhalb der ersten Woche nach Transplantation, und führt fast immer zu einem Verlust des Spenderorgans [31;54]. Bei nierentransplantierten Kindern finden sich sogar Inzidenzen bis zu 20% [84] Auch Thrombosen in der arteriellen Strombahn haben eine hohe Inzidenz für den Organverlust [7]. In ähnlich hohen Fallzahlen treten tiefe Beinvenenthrombosen oder Lungenembolien im Rahmen von Nierentransplantationen auf [54] und führen transplantatunabhängig zu Komplikationen. Mikrothromben finden sich häufig in Nierenbiopsaten bei Abstoßungs- und Entzündungsreaktionen [77]. Neben angeborenen Gerinnungsstörungen [40] werden auch Immunsuppressiva als Ursache thrombotischer Komplikationen vermutet.

Dies gilt auch für Rapamycin, ein neueres Immunsuppressivum, welches 1991 von der US Food and Drug Administration zugelassen wurde. Mittlerweile hat es sich in Deutschland als Immunsuppressivum fest in der Klinik etabliert. Auch hat es bereits Einzug in die

immunsuppressive Therapie von Kindern gefunden [37;48]. Es finden sich immer wieder Fallberichte, in denen es unter immunsuppressiver Therapie mit Rapamycin zu thrombotischen Ereignissen gekommen ist sowohl bei Nierentransplantierten [81;9] als auch bei Lebertransplantierten [91].

Studien in den USA unter 15870 Patienten zeigten, dass das Risiko für thrombotische Ereignisse in den ersten drei Monaten nach Organtransplantation am höchsten ist [75]. Ein Risikofaktor hierbei war u.a. die initiale Therapie mit Rapamycin. Die Kombination mit einem weiteren Immunsuppressivum, z.B. Rapamycin mit Cyclosporin, scheint ebenfalls ein Risikofaktor für thrombotische Komplikationen zu sein [30;76].

Andererseits finden sich auch Berichte, nach denen Rapamycin keinen Risikofaktor für ein erhöhtes Auftreten von thrombotischen Komplikationen darstellt [57;25]. Es wird beschrieben, dass nach Auftreten derartiger Zwischenfälle ein Wechsel des immunsuppressiven Regimes auf Rapamycin sogar zu einem Erhalt des Transplantats führen kann [26].

Bislang ist nicht ausreichend geklärt, welche Ursachen für die Entstehung von Thrombosen im Rahmen einer immunsuppressiven Therapie verantwortlich sind. Eine wichtige Rolle bei der Bildung von Fibrinablagerungen in Zusammenhang mit der Gabe von Rapamycin könnte einem zentralen Molekül der Blutgerinnungsaktivierung, dem Tissue factor (TF), zukommen.

Seine Konzentration ist bei Transplantatempfängern regelhaft erhöht. In Tieruntersuchungen konnte eine erhöhte TF-Konzentration in Monozyten nach allogener Nierentransplantation gefunden werden [79;78]. Besonders in den Venen transplantiertter Nieren fand sich eine hohe Zahl Tissue factor exprimierender Monozyten [33].

Monozyten sind immunkompetente Zellen, welche eine entscheidende Rolle bei entzündlichen Prozessen wie z.B. einer Abstoßungsreaktion spielen. Sie zirkulieren frei im Blut und kommen somit ubiquitär im

menschlichen Körper vor. Monozyten sind in der Lage, verschiedenste Botenstoffe zu produzieren und frei zu setzen, u.a. den Gerinnungsaktivator Tissue factor.

1.1 Fragestellung

Mit dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob das Immunsuppressivum Rapamycin die Expression von Tissue factor in humanen Monozyten verändert. Hier könnte eine mögliche pathophysiologische Erklärung für die beobachteten thrombotischen Ereignisse unter Rapamycintherapie nach Nierentransplantation liegen. Es wäre denkbar, diesen Ansatz für eine therapeutische Intervention oder sogar Prävention thrombotischer Komplikationen unter Anwendung von Rapamycin zu nutzen.

2 Grundlagen

2.1 Tissue factor

Eine effektive Blutgerinnung gehört zu den wesentlichen Körperfunktionen, um ein langfristiges Überleben zu sichern. Kommt es zu einer Gefäßverletzung, muss die betroffene Stelle rasch verschlossen werden. Ein lebensbedrohlicher Blutverlust kann so verhindert werden. Zum Erreichen einer adäquaten Blutgerinnung verfügt der menschliche Körper über eine Reihe verschiedener Faktoren. Einer von ihnen ist der Tissue factor (TF), auch Gewebefaktor oder Faktor III genannt. Er ist der Initiator der extrinsischen Kaskade der Blutgerinnung.

2.1.1 Aufbau

Lokalisiert auf Chromosom 1 (1pter - 1p21) [14] weist das Gen für den humanen Tissue factor 6 Exons und 5 zwischengeschaltete Introns auf. Es umfasst insgesamt 12400 Basenpaare.

Biochemisch handelt es sich um ein 45 Kilodalton schweres Glykoprotein, bestehend aus 263 Aminosäuren [38;82]. Entsprechend seinem transmembranösen Charakter kann man eine hydrophile intrazelluläre, eine hydrophobe transmembranöse und eine hydrophile extrazelluläre Domäne unterscheiden. Die intrazelluläre Domäne ist mit 21 Aminosäuren (AS 243 - 263) die kürzeste, gefolgt von der transmembranösen mit 23 Aminosäuren (AS 220 - 242), welche für die Verankerung des TF-Proteins verantwortlich ist. Mit 219 Aminosäuren ist die extrazelluläre Domäne (AS 1 - 219) die längste. Sie verfügt über ein aktives Zentrum, das als Rezeptor für den Gerinnungsfaktor VII/VIIa fungiert [8] und somit prokoagulatorisch wirkt.

2.1.2 Vorkommen

Tissue factor befindet sich auf der abluminalen Gefäßseite, z.B. der Adventitia von Blutgefäßen oder gefäßnahen Fibroblasten. In parenchymatösen Organen wie Leber, Milz oder Niere lässt er sich ebenfalls nachweisen [29]. Hohe Konzentrationen von TF finden sich in den Glomeruli und an den Basalmembranen [23] von gesunden Nieren. Bei transplantierten Nieren ist TF zusätzlich in der Kapsel und der Adventitia von Nierengefäßen vermehrt vorhanden [12]. Bei Ratten fand sich eine hohe Zahl TF exprimierender Monozyten in den Venen von transplantierten Nieren [33].

Auf ruhendem Endothel ist kein Tissue factor zu finden. Somit besteht unter physiologischen Bedingungen kein Kontakt mit zirkulierendem Blut und folglich kommt es zu keiner Aktivierung der Gerinnung.

Makrophagen und Monozyten sind zur Produktion von TF in der Lage. Sie sind die einzigen zirkulierenden Zelltypen, die TF exprimieren können. Eine Zunahme der TF-Konzentration in Monozyten ist u.a. während entzündlicher oder hypoxischer Zustände festzustellen. In Tieruntersuchungen konnte eine erhöhte TF-Expression in Monozyten nach allogener Nierentransplantation gefunden werden [79;78].

2.1.3 Funktion

TF ist der Hauptinitiator der extrinsischen Gerinnungskaskade. Zu einer Initiierung der Gerinnung kommt es z.B. im Falle einer Gefäßverletzung, wenn Blut das Gefäßsystem verlässt und mit TF-Molekülen in Berührung kommt. Aber auch unter septischen oder hypoxischen Bedingungen kann es zu einer Aktivierung der Blutgerinnung kommen.

Dabei wird der im Blut frei zirkulierende Faktor VII durch Vermittlung von Ca^{2+} -Ionen in der Nähe des TF-Moleküls an die Zellmembran z.B. einer Gewebezelle gebunden [74]. Hierfür ist die extrazelluläre Domäne des Tissue factors verantwortlich, eine proteolytische Modifikation derselben ist nicht erforderlich [5]. Faktor VII selbst ist eine Serin-Protease. Sie ist ein einkettiges Glykoprotein mit 10 γ -Carboxyglutamatresten und wird Vitamin K abhängig in der Leber synthetisiert.

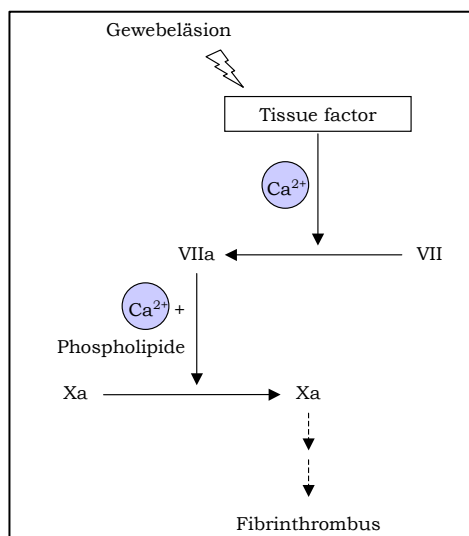


Abb. 2-1

Aktivierung der extrinsischen Gerinnungskaskade via TF nach einer Gewebeläsion.

Durch die oben beschriebene Anlagerung an die Zellmembran kommt es über die proteolytische Domäne an Faktor VII zu einer Konformationsänderung, in deren Folge der Faktor aktiviert wird (Faktor VIIa) [44]. TF fungiert somit als eine Art Co-Faktor [62]. Faktor VIIa ist im Zusammenspiel mit Phospholipiden und Ca^{2+} -Ionen in der Lage, den Faktor X als Substrat zu nutzen und ihn zu Faktor Xa umzusetzen (☞ Abb. 2-1).

Am Ende der so angestossenen extrinsischen Gerinnungskaskade steht die Fibrinvernetzung, es bildet sich ein Thrombus.

Hemmend auf diesen Gerinnungsweg wirkt der TFPI (Tissue factor pathway inhibitor) [32]. Dieser inhibiert den aktivierten Faktor X und führt darüber hinaus noch zu einer Feedback-Hemmung des Komplexes aus Faktor VII und TF.

2.1.4 Regulierung der TF-Expression in Monozyten

Die TF-Expression in Monozyten steht unter transkriptionaler Kontrolle. Dabei kommt einer Serin/Threonin Phosphatase, dem Calcineurin (Cn), eine wichtige Rolle zu. Aktiviert über eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels führt Calcineurin u.a. zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Dieser diffundiert in den Zellkern und lagert sich an der entsprechenden Stelle des TF-Promotors an. Dies bedeutet die Induktion der TF-mRNA-Transkription.

Monozyten können von Th1-Zellen zur TF-Produktion angeregt werden. Bei der Steuerung der Expression können zwei unabhängige Mechanismen unterschieden werden [34]. Zum einen können Th1-Zellen via den CD40-Rezeptor an Monozyten binden und sie zur Expression von Tissue factor bringen [72]. Zum anderen sind Th1-Zellen in der Lage ohne direkten Zellkontakt eine Induktion von TF zu erwirken [21]. Hierbei werden Zytokine wie z.B. TNF- β oder IL-2 von den Th1-Zellen ausgeschüttet und gelangen über den Blutweg zu den Zielzellen.

Das C-reaktive Protein (CRP) scheint nicht direkt in der Lage zu sein, eine TF-Expression in Monozyten zu induzieren. Diskutiert wird jedoch eine Anregung über Cross-talk via andere Zellen [70].

Auch Endotoxine wie z.B. Lipopolysaccharid (LPS), ein Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien, können Monozyten zur Expression von TF anregen [87;94]. Hierbei spielt der CD14-Rezeptor

(LPS bindet an CD14) eine wichtige Rolle [16]. Die Proteinkinase C (PKC) ist in den Signalweg involviert [18].

Auch Hypoxie führt zu einer Zunahme von TF in Monozyten [99]. In hypoxischer Umgebung und unter Einfluss von LPS kann ein additiver Effekt beobachtet werden [43].

Des Weiteren können Monozyten bei Kontakt mit geschädigten Endothelzellen zur TF-Expression angeregt werden. Insbesondere im Zusammenspiel mit inflammatorischen Zytokinen ist eine deutliche Zunahme von TF zu beobachten [17]. Thrombozytenkontakt kann ebenfalls zu einer vermehrten TF-Produktion führen [4;83].

Hemmenden Einfluss auf die Expression von TF in Monozyten haben verschiedene von Th2-Zellen produzierte Zytokine. So sind IL-4, IL-10 und IL-13 in der Lage, die von Th1-Zellen induzierte Expression von Tissue factor zu inhibieren [21;69]. Eine durch LPS hervorgerufene Zunahme von TF in Monozyten kann durch IL-4 gehemmt werden [28;16;73].

Einige Immunsuppressiva können die TF-Konzentration in Monozyten senken. Cyclosporin A (CsA) inhibiert die Expression von TF in Monozyten [45]. Dabei bindet Cyclosporin mit hoher Affinität an Cyclophiline (Cyp). Dieser Cyp-CsA-Komplex inhibiert Calcineurin und wirkt so hemmend auf die TF-Transkription [46].

2.2 Rapamycin

2.2.1 Chemische Struktur

Rapamycin (Sirolimus®, Rapamune®) wurde erstmals 1975 aus dem Bakterium *streptomyces hygroscopicus* isoliert, welches aus Bodenproben der Osterinseln stammt. Die Einheimischen nennen die

Osterinseln *Rapa Nui*, was dem Stoff den Namen gab. Heute wird Rapamycin industriell hergestellt.

Seine chemische Strukturformel lautet $C_{51}H_{79}NO_{13}$ (☞ Abb. 2-2). Das Molekulargewicht beträgt 914,18 u, der Schmelzpunkt liegt bei etwa 184 °C. Eine grosse Anzahl möglicher Stereoisomere ergibt sich aus den 15 Chiralitätszentren des Moleküls.

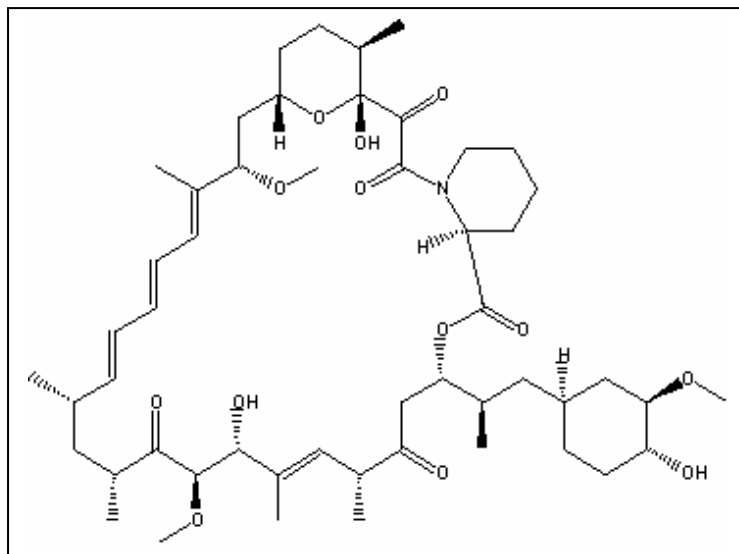


Abb. 2-2

Strukturformel von Rapamycin

2.2.2 Wirkung

Zielzellen von Rapamycin sind u.a. Zellen des immunologischen Systems wie T-Zellen, dendritische Zellen und Monozyten.

Rapamycin penetriert die Membran der Zielzellen und bindet intrazellulär an FKBP-12 (FK-Binding Protein). Das Protein FKBP-12 besteht aus 107 Aminosäuren, die zentral als α -Helix und um diese herum als β -Faltblatt strukturiert sind [95]. Die Bindungsstelle für Rapamycin befindet sich eingebettet zwischen diesen beiden Anteilen.

Der Komplex Rapamycin/FKBP als solcher ist jedoch nicht für die immunsuppressiven Fähigkeiten von Rapamycin verantwortlich. Erst

die anschließende Bindung des Rapamycin/FKBP-Komplexes an mTOR (mammalian target of rapamycin) führt zu den beobachtbaren Wirkungen.

Ist FKBP-12 gleichzeitig auch das Bindungsprotein für andere Immunsuppressiva wie z.B. FK506 und konkurriert mit diesem um den Rezeptor, so unterscheidet sich Rapamycin doch hinsichtlich seines Eingreifens in den Zellzyklus vom FK506/FKBP-Komplex [60].

FK506 oder Cyclosporin A gehören zur Gruppe der Calcineurininhibitoren [11;59]. Calcineurin ist das Schlüsselmolekül beim Übergang der T-Zellen von der G0- in die G1-Phase. Immunsuppressive Substanzen dieses Typs lassen somit die T-Zellen im Ruhezustand verharren. Da eine Aktivierung von Calcineurin auch zu einer Abnahme der TF-Konzentration führt, ist z.B. unter Cyclosporin A Therapie eine Reduktion der TF-Expression in Monozyten zu finden [45].

Durch Rapamycin hingegen wird der Zellzyklus gegen Ende der G1-Phase gestoppt [3;2]. Die Proliferation der Zellen wird verhindert und deren Apoptose eingeleitet [97]. Dieser Effekt wird vornehmlich an bereits aktivierten T-Zellen beobachtet. Zu erklären ist dies mit der überwiegenden Bindung von Rapamycin an Zellen, die sich im Übergang von der G1- zur S-Phase befinden. Zu Zellen am Ende der G0- bzw. Anfang der G1-Phase zeigt Rapamycin eine deutlich geringere Affinität. Der apoptotische Effekt ist ausgeprägt nachweisbar bei T-Lymphozyten und dendritischen Zellen, nicht hingegen bei Monozyten [66;97].

Die immunsuppressive Wirkung entfaltet Rapamycin über die mTOR. Diese regeln vielfache Aufgaben innerhalb der T-Zelle, darunter wichtige Schritte des Zellwachstums und der Proteinsynthese.

Zum einen aktivieren mTOR den Transkriptionsfaktor TIF-IA. Dieser reguliert die Transkription der rRNA-Synthese. Durch die von Rapamycin induzierte Hemmung der mTOR unterbleibt die Aktivierung von TIF-IA und konsekutiv die Initiation der Transkription am

rRNA-DNA-Promotor [64]. Die Synthese der Ribosomen wird verhindert und somit letztlich die Proteinsynthese [88].

Der Übergang der T-Zellen von der G- in die S-Phase wird ebenfalls maßgeblich über mTOR gesteuert. Reguliert wird dieser Schritt über die p70S6-Kinase und den Initiationsfaktor 4EBP1. Rapamycin inhibiert via mTOR die p70S6-Kinase und 4EBP1 und reduziert so die Translation verschiedener mRNA für ribosomale Proteine [24].

Gleichzeitig setzt Rapamycin die Aktivität des cdk2-cyclinE-Komplexes herab, welcher ein wichtiger Regulator des G1/S-Transfers ist [39].

Rapamycin verlängert so die G1-Phase und verhindert bzw. verzögert damit einen Eintritt in die S-Phase [89].

2.2.3 Pharmakologische Daten

Rapamycin wird nur wenig vom Darm resorbiert. Die Bioverfügbarkeit bei oraler Gabe beträgt etwa 15%. Die initiale Dosis ist hoch und wird langsam an die Erhaltungsdosis angeglichen. Der angestrebte Wirkspiegel im Plasma liegt bei 10-20 ng/ml. Rapamycin wird in der Leber vom P450-Isoenzym CYP3A4 metabolisiert. Die Halbwertszeit bei nierentransplantierten Patienten beträgt etwa 60 Stunden.

Die am häufigsten beobachteten Nebenwirkungen von Rapamycin sind Hyperlipoproteinämie und Hypertriglyceridämie. Des Weiteren werden Hypokaliämien, Arthralgien, Diarrhöen und Blutbildveränderungen i.S. einer Abnahme von Thrombozyten, Erythrozyten und Leukozyten beschrieben. Diese Nebenwirkungen nehmen häufig nach Reduzierung der Dosierung [71] oder nach Kombination mit einem anderen Immunsuppressivum ab [55]. Auch finden sich immer wieder Fallberichte über thrombotische Komplikationen [81;9] oder Wundheilungsstörungen [36].

2.2.4 Einsatzgebiete

Rapamycin gehört strukturell in die Gruppe der Makrolidantibiotika. Es hat inhibitorische Effekte auf die Proliferation von Lymphozyten und Fibroblasten und zeigt antineoplastische Effekte. Eingesetzt wird es allerdings vornehmlich aufgrund seiner immunsuppressiven Eigenschaften in der Transplantationsmedizin, besonders bei Nieren- und Lebertransplantationen.

Kam es früher meist in Kombination mit anderen Immunsuppressiva zum Einsatz, so findet es heute oft als Basis- bzw. Monosubstanz Verwendung [52].

Studien zufolge kommt es zu einer signifikanten Abnahme von Abstoßungsreaktionen nach allogenen Nierentransplantationen bei Verwendung von Rapamycin [96;71]. In Bezug auf das Kurzzeitüberleben ist dies insbesondere in Kombination mit anderen Immunsuppressiva zu beobachten [51;100;55]. Auch als „add-on-Therapie“ kommt Rapamycin zum Einsatz [93]. Was das Langzeitüberleben betrifft, gibt es unterschiedliche Ansichten. In einigen Studien stellt Rapamycin als Monosubstanz hier eine gute Alternative dar [49;61]. Andere Autoren sehen jedoch keinen längerfristigen Vorteil nach einer Nierentransplantation [1]. Nach Lebertransplantation scheint Rapamycin Vorteile zu haben, beweisende Studien fehlen allerdings noch [91].

Nicht nur zur Verhinderung der Abstoßung von Spenderorganen durch den Wirt kann Rapamycin erfolgreich eingesetzt werden. Bei der sogenannten Graft-versus-Host-Disease (GVHD), dem Auftreten von Abstoßungsreaktionen an körpereigenen Organen durch fremde immunkompetente Zellen nach einer Knochenmarktransplantation, kann Rapamycin mit Effizienz verwendet werden [15].

Den wachstumshemmenden Effekt macht man sich u.a. bei der Verhinderung von Restenosen nach koronararteriellen

Stentimplantationen zu Nutzen. Dabei wird die metallene Oberfläche der Stents mit z.B. $140 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Rapamycin beschichtet (sirolimus-eluting stent [SES]). Das Ziel ist es, eine durch Endothelzellwachstum hervorgerufene in-stent Restenose zu verhindern. Es gibt Studien, nach denen Patienten mit eingesetzten SES eine signifikant niedrigere Restenoserate und ein besseres klinisches Outcome als Patienten mit konventionellen Stents aufweisen [85;58;20].

Darüber hinaus wurden weitere mögliche Einsatzgebiete von Rapamycin untersucht. Zum Beispiel konnte im Mausmodell das Tumorwachstum sowohl von Primärtumoren als auch von Metastasen durch den Einsatz von Rapamycin verhindert werden. Dies scheint auf einem antiangiogenetischen Effekt zu beruhen. Dabei kommt es sowohl zu einer Reduktion des vascular endothelial growth factor (VEGF) selbst als auch zu einer Abnahme der durch ihn hervorgerufenen Zellantwort [35]. Auch das via mTOR regulierte Zellwachstum scheint einen wichtigen Ansatz für eine antineoplastische Therapie zu bieten [47;65].

3 Material und Methoden

3.1 Reagenzien

Kulturmedien

| | |
|---------|--|
| 0 % FCS | 500 ml RPMI 1640-Medium + 5 ml Hepes-Buffer + 1,7 ml β -Mercaptoethanol [1 μ l/ml] + Pe- nicillin/Streptomycin + L-Glutamin [200 MM] |
| 5 % FCS | 500 ml RPMI 1640-Medium + 5 ml Hepes-Buffer + 1,7 ml β -Mercaptoethanol [1 μ l/ml] + Pe- nicillin/Streptomycin + L-Glutamin [200 MM] + 25 ml FCS |

Enzyme

| | |
|---|----------------------------|
| DNase Trockensubstanz aus dem RNase-free DNase Set + 550 μ l aqua dest. | Qiagen (Hilden) |
| Reverse Transcriptase Moloney Murine Leukemia Virus Rever- se Transcriptase (MMuLV-RT) [50 U/ μ l] | Stratagene (Heidelberg) |
| Taq DNA Polymerase [5 U/ μ l] | Invitrogen (Groningen, NL) |

Primer

| | |
|--|----------------------|
| β -Actin down [10 μ M] | Biometra (Göttingen) |
| Sequenz: 5' TCT CCA TGT CGT CCC AGT TG 3' | |
| β -Actin up [10 μ M] | Biometra (Göttingen) |
| Sequenz: 5' ATG GAT GAT GAT ATC GCC GCG 3' | |

Tissue factor down [10 μ M] Biometra (Göttingen)

Sequenz: 5' CCC CTT CTT TTC ACC ATT CCT A 3'

Tissue factor up [10 μ M] Biometra (Göttingen)

Sequenz: 5' TAT CAC AGC CCT CTT CAC ACA TT 3'

Antikörper

anti-CD 14^{PE} MAb

Becton Dickinson No. 347497
(San Jose, USA)

anti-TF^{FITC} MAb

american diagnostica inc.
No. 4508CJ (Greenwich, UK)

hergestellte Lösungen, Puffer und Marker

Φ x 174 HAE III-Marker

0,1 ml Φ x 174 HAE III + 0,2 ml
Loading Buffer + 1,2 ml TRIS-
Puffer

FACS-Puffer
(NaN₃ 0,1 %)

500 ml PBS w Ca/Mg + 250 mg
NaN₃ + 250 μ l FCS

Percolllösung I

9 ml Percoll +
1 ml PBS-Instamed [10 x]

Percolllösung II [57 %]

25,7 ml Percolllösung I
+19,3 ml 0 % FCS

TAE [50 x]

9,3 g EDTA [0,5 M] + 121 g TRIS +
28,6 ml Eisessig mit aqua dest. auf
500 ml (pH = 8,0)

TAE-Puffer

2 ml TAE [50 x] + 98 ml aqua dest.

TRIS-Puffer

7,9 g TRIS + 2,9 g NaCl +
5,1 g MgCl₂ (pH = 8,0)

Triton-X 0,1 %

100 μ l Triton-X-100 +
100 ml 0,1 % NaCitrat

Reagenzien

| | |
|---|-------------------------------|
| Φ x 174 HAE III | Sigma (Saint Louis, USA) |
| β-Mercaptoethanol | Sigma (Taufkirchen) |
| 10 x MMuLV RT Buffer | Stratagene (Heidelberg) |
| Agarose | PeQLab (Erlangen) |
| Bromphenolblau | Sigma (Taufkirchen) |
| Buffer RDD enthalten im RNase-Free DNase Set | Qiagen (Hilden) |
| Buffer RLT enthalten im RNAeasy® Mini Kit | Qiagen (Hilden) |
| Buffer RPE enthalten im RNAeasy® Mini Kit | Qiagen (Hilden) |
| Buffer RW 1 enthalten im RNAeasy® Mini Kit | Qiagen (Hilden) |
| dNTP's [10 mM] (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) | BioLabs |
| EDTA [0,5 M] | Sigma (Taufkirchen) |
| Eisessig (Essigsäure 100 %) | Merck (Darmstadt) |
| Ethanol | Roth (Karlsruhe) |
| Ethidiumbromid [1 mg/ml] | |
| Fetal-Calf-Serum (FCS) | Biochrom AG seromed® (Berlin) |
| Hepes-Buffer | Biochrom AG seromed® (Berlin) |
| L-Glutamin | Gibco (Karlsruhe) |
| Lymphozyten-Separationsmedium | PAA (Linz, A) |
| MgCl [50 mM] enthalten im Taq DNA Polymerase Set | Invitrogen (Groningen, NL) |
| NaN ₃ | Merck (Darmstadt) |
| Paraformaldehyd | |

| | |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| PBS w Ca/Mg | PAA (Linz, A) |
| PBS w/o Ca/Mg | PAA (Linz, A) |
| PBS-Instamed [10 x] [9,55 g/l] | Biochrom AG seromed® (Berlin) |
| PCR Puffer [10 x] | Invitrogen (Groningen, NL) |
| pd (N) 6 [100 µM] | Boehringer-Roche (Mannheim) |
| Penicillin/Streptomycin | Biochrom AG seromed® (Berlin) |
| Percoll | Amersham Pharmacia Biotech AB |
| RPMI 1640 [1x] | PAA (Linz, A) |
| TRIS | Sigma (Taufkirchen) |
| Triton-X-100 | Merck (Darmstadt) |

3.2 Arbeitsmaterialien

| | |
|--|--|
| 24-well-Platten | Falcon® / Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA) |
| Leucosept-Röhrchen | Greiner bio-one (Solingen) |
| Micro tubes (1,5 ml) | Sarstedt (Nümbrecht) |
| PCR Softtubes (0,2 ml) | BIOzym (Oldendorf) |
| PP-Röhrchen (14 ml) | Greiner bio-one (Solingen) |
| PP-Röhrchen (50 ml) | Greiner bio-one (Solingen) |
| Qiashredder | Qiagen (Hilden) |
| RNeasy mini spin column enthalten im RNeasy® Mini Kit | Qiagen (Hilden) |
| Rundbodenröhrchen (5 ml) | Falcon® / Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA) |

3.3 Geräte

| | |
|---|--|
| FACScan™ flow cytometer Software: Lysis II | Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA) |
| Kühltruhe | SANYO (Japan) |
| Kühlzentrifuge (Biofuge 28 RS) | Heraeus (Düsseldorf) |
| Lichtmikroskop | Zeiss (Jena) |
| Mikrozentrifuge | Uniequip (München) |
| PCR-Elektrophoresekammer | Biometra (Düsseldorf) |
| pH-Meter | Biometra (Düsseldorf) |
| Photometer (Spectra Mini AP) Software: easyWIN fitting | Tecan (Grödig, A) |
| RNA/DNA Calculator (Gene Quant II) | Pharmacia Biotech (Cambridge, UK) |
| sterile Werkbank (HA 2472 GS) | Heraeus (Düsseldorf) |
| Stromquelle (Power Pack P25) | Biometra (Düsseldorf) |
| UV-Licht Generator | Konrad Benda (Wiesloch) |
| UV-Schirm | Rothaar & Schroeder (Heidelberg) |
| Wärmeblock (DRI-Block DB 2 A) | Techne (Cambridge, UK) |
| Wärmeschrank | Heraeus (Düsseldorf) |
| Zentrifuge (TJ-6 Centrifuge) | Beckmann (Palo Alto, USA) |

3.4 Zellpräparation

3.4.1 Separation der Monozyten

Bei den untersuchten Zellen handelt es sich um humane Monozyten von gesunden Spendern. Isoliert werden die Zellen aus Buffycoats. Diese wurden zunächst vom Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Münster, später vom DRK-Blutspendedienst Münster bezogen. Buffycoats sind Zentrifugate aus Vollblutspenden, die neben wenigen Erythrozyten hauptsächlich weiße Blutkörperchen und Blutplättchen enthalten.

Der gesamte Inhalt der Buffycoats (~ 40 ml) wird in sterile 50 ml PP-Röhrchen umgefüllt und mit PBS w/o Ca/Mg auf 50 ml aufgefüllt. Es werden jeweils 25 ml in zwei Leucoseptröhrchen überführt. Diese wurden vorher mit 15 ml Lymphozyten-Separationsmedium (Dichte 1,077g/ml) gefüllt, welches durch kurze Zentrifugation unter die ca 2,5 mm dicke Polyester membran gebracht wurde. Anschließend erfolgt die Zentrifugation der Röhrchen 20 min bei 2200 rpm. Hierbei trennen sich die einzelnen Bestandteile gemäß ihrer Dichte. Unten befinden sich die Erythrozyten, darüber das Lymphozyten-Separationsmedium, auf dem die Fraktion der Leukozyten lagert, und dann folgt das Plasma.

Nun kann problemlos die weiße Interphase mit den Leukozyten heraus pipettiert und in ein neues Röhrchen überführt werden. Da unvermeidbar benachbarte Biocoll-Separating-Solution und Plasma mit abgenommen wird, gibt man der heterogenen Lösung PBS w Ca/Mg zu und zentrifugiert erneut (10 min bei 1200 rpm). Die Monozyten befinden sich anschließend in dem Pellet, welches sich am Boden abgesetzt hat. Den Überstand verwirft man.

Das Pellet wird nun in 40 ml Percolllösung II gelöst. Es folgt die weitere Auftrennung. Hierzu werden in sterile 14 ml-PP-Röhrchen

2 ml PBS w Ca/Mg, 5 ml Zelllösung und obenauf 1 ml Percolllösung I geschichtet und zentrifugiert (30 min, 3000 rpm bei 4 °C).

Die entstehende leukozytäre Interphase wird herauspipettiert und mit PBS w Ca/Mg auf 50 ml aufgefüllt. Hiervon entnimmt man 50 µl und verdünnt sie mit 450 µl PBS w Ca/Mg. Von diesen 500 µl werden einige Mikroliter verwendet, um die darin befindlichen Zellen in einer Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop zu zählen.

Die restlichen fast 50 ml werden erneut zentrifugiert, der Überstand durch 0 % FCS ersetzt und das Pellet resuspendiert.

Es folgt das Ausbringen der Lösung auf 24-well-Platten in einer Dichte von etwa $4 - 5 \times 10^6$ Zellen/well und die einstündige Inkubation der Platten bei 37 °C. Dabei adhären die Monozyten auf dem Plattenboden.

3.4.2 Stimulation der Monozyten

Nach der einstündigen Adhärenzzeit werden die Zellen zweimal vorsichtig mit PBS w Ca/Mg gewaschen. Dann erfolgt die Stimulierung der Zellen durch Zugabe von je 1 ml/well entsprechender Stimulantienlösung.

Die anschließende Inkubation der Zellen findet bei konstanten 37 °C und einem Gasgemisch von 5,0 Vol% CO₂ und 95,0 Vol% Außenluft statt. Die Inkubationsdauer im Wärmeschrank beträgt für jeden Versuch 18 Stunden.

Nach Ablauf der Inkubation werden die Medien mit den Stimulanzen durch einfaches Abgießen entfernt und durch PBS w/o Ca/Mg ersetzt. Die Zellen lagern dann für 10 min auf Eis. Die Monozyten lassen sich so problemlos aus den wells entfernen und in sterile Rundbodenröhrchen überführen. Es folgt die Zentrifugation und das Abpipettieren der

Flüssigkeitssäule über dem Pellet. Das trockene Pellet kann nun bis zur weiteren Verwendung bei – 80 °C gelagert werden.

3.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

3.5.1 Prinzip der PCR

Mittels der PCR ist es möglich, auch kleinste Mengen DNA fast beliebig oft zu vervielfältigen.

Edukt ist entweder DNA oder RNA. DNA kann direkt vervielfältigt werden, RNA muss zunächst enzymatisch mittels reverse transcriptase (RT) in cDNA umgeschrieben werden. Ausgehend von DNA bzw. cDNA werden zunächst die komplementären Stränge getrennt (denaturiert), so dass die Basenpaare gelöst werden und die einzelnen Basen frei liegen. Je nach zu vervielfältigendem Abschnitt werden entsprechende Primer zugegeben. Primer sind Oligonukleotide, welche kurze Basensequenzen des gewünschten Abschnitts enthalten. Diese Primer lagern sich entsprechend ihrer Basenfolge an den komplementären Abschnitt der denaturierten DNA an. Das Enzym Taq-Polymerase verlängert nun ausgehend von dem angelagerten Primer den DNA-Strang. Anschließend wird der neu entstandene DNA-Doppelstrang wieder denaturiert und der Prozess beginnt von vorn.

So lässt sich ein gewünschter DNA-Abschnitt exponentiell vermehren. Am Ende der PCR kann das Produkt mittels einer Gelelektrophorese nach Ethidiumbromidfärbung im UV-Licht sichtbar gemacht werden.

3.5.2 RNA-Präparation

Die Präparation der RNA erfolgt gemäß den Protokollen „RNeasy® Mini Handbook“ (Seiten 22 - 25) und „RNase-Free DNase Set Protocol“ der Firma Qiagen.

Ausgangsmenge sind die Zellen aus jeweils drei wells einer 24-well-Platte. Dies sind etwa 6×10^6 Zellen. Laut Protokoll wird dieser Anzahl entsprechend zunächst das Pellet mit den Monozyten in 600 μ l Buffer-RLT plus 6 μ l β -Mercaptoethanol resuspendiert. Hierdurch werden die Zellen lysiert. Das im Buffer-RLT enthaltene denaturierte Guanidin-Isothiocyanat (GITC) inaktiviert mögliche RNAsen. Es folgt die Überführung des Lysats in einen Qiashreder. Dieser wird 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert, wobei sich die Probe homogenisiert. Der Shredder kann anschließend verworfen werden. Dem homogenisierten Zentrifugat werden 600 μ l Ethanol 70 % zugemischt, durch welches die Bedingung zur Bindung der RNA an die Membran der RNeasy mini spin column geschaffen wird. In diese Säule pipettiert man 600 μ l des Zentrifugats. Die folgende Zentrifugation erfolgt 15 sek bei 10000 rpm. Nach Entsorgen des Zentrifugats wird der Schritt anschließend mit den restlichen 600 μ l wiederholt. Nun befindet sich die gesamte RNA mit mehr als 200 Nukleotiden im Filter der RNeasy mini spin column. RNA mit weniger als 200 Nukleotiden (z.B. tRNA) verbleibt nur in nicht nennenswerter Menge. Auf diese Membran werden jetzt 350 μ l Buffer RLT gegeben und 15 sek bei 10000 rpm zentrifugiert.

Um die in der RNeasy mini spin column festgehaltene DNA zu eliminieren, gibt man nun 10 μ l DNase I stock-solution und 70 μ l Buffer RDD genau auf die Membran der RNeasy mini spin column. Der DNA-Verdau erfolgt bei 37 °C über 15 min im Wärmeblock.

Zur Entfernung der DNase I aus der Membran wird nach 15 min erneut einmal mit Zugabe von 350 μ l Buffer RLT zentrifugiert. Anschließend werden 500 μ l Buffer RPE in die Säule pipettiert und 15 sek bei 10000 rpm zentrifugiert. Es folgt die erneute Zugabe von 500 μ l Buffer RPE und eine zweiminütige Zentrifugation bei 13000 rpm zum Trocknen der Membran.

Um die RNA aus der RNeasy mini spin column zu eluieren, wird 25 μ l RNase-freies destilliertes Wasser auf die Membran gegeben und 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Das Zentrifugat wird in 1,5 ml Micro Tubes aufgefangen, in welche die Membranen gestellt wurden. Diesen Schritt wiederholt man mit weiteren 25 μ l RNase-freiem destilliertem Wasser, sodass insgesamt 50 μ l RNA-haltige Lösung zur Verfügung steht.

3.5.3 Umschreibung der mRNA auf cDNA

Zunächst wird ein Mastermix mit den notwendigen Ausgangssubstanzen hergestellt. Dieser enthält für jede Probe 0,5 μ l 10x StrataScript Buffer, 0,5 μ l dNTP's [10 mM], 0,25 μ l pd (N) 6 [100 μ M] und 0,25 μ l reverse transcriptase [50 U/ μ l]. Die Gesamtmenge ergibt 1,5 μ l. Zu jeweils 1,5 μ l des Mastermixes werden 3,5 μ l des RNA-Templates pro Probenansatz pipettiert. Die reverse transcriptase (RT) arbeitet anschließend 60 min bei 37 °C. Dabei ist eine Unit RT in der Lage bei 37 °C in 10 min 1 nmol dNTP umzusetzen.

Im Ergebnis erhält man 5 μ l cDNA-Templete.

3.5.4 PCR

Zunächst wird ein Mastermix mit den notwendigen Ausgangssubstanzen hergestellt. Dieser enthält für jede Probe 2 µl 10x PCR-Puffer, je 2 µl Primer Up [10 µM] und 2 µl Primer Down [10 µM] für den gesuchten DNA-Abschnitt (☉ Tab. 3-1), 0,8 µl MgCl [50 mM], 0,4 µl dNTP's [10 mM], 12,7 µl aqua bidest. und 0,1 µl Taq-Polymerase [5 U/µl]. Die Gesamtmenge ergibt 20 µl.

Zu diesen jeweils 20 µl des Mastermixes werden 5 µl des cDNA-Templates pro Probenansatz pipettiert.

Nachfolgend ist die Prozessführung für die PCR beschrieben.

Zunächst werden die Proben auf 95 °C erhitzt. Ziel ist es, eventuelle proteinhaltige Verunreinigungen (z.B. auch die RT) zu denaturieren. Die nächsten drei Schritte haben eine Gesamtzeit von 2 min und werden insgesamt je 30 mal wiederholt. Initial erfolgt 30 sek lang bei 95 °C die Denaturierung der DNA. Die Primer lagern sich in den nächsten 30 sek bei spezifischen Temperaturen an (☉ Tab. 3-1). Die Taq-Polymerase amplifiziert anschließend die DNA-Stränge bei 72 °C während weiterer 60 sek.

| | Primer up | Primer down | Annealing-Temp. [° C] |
|---------------|---|--|-----------------------|
| b-Actin | 5' ATG GAT GAT GAT ATC GCC GCG 3' | 5' TCT CCA TGT CGT CCC AGT TG 3' | 55,0 |
| Tissue factor | 5' TAT CAC AGC CCT CTT CAC ACA TT 3' | 5' CCC CTT CTT TTC ACC ATT CCT A 3' | 59,0 |

Tab. 3-1

Primersequenzen für β-Actin und Tissue factor sowie die optimalen Temperaturen für deren Anlagerung während der PCR.

Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgt bei – 80 °C.

3.5.5 Gelelektrophorese

Zum Nachweis der jeweiligen DNA-Fragmente wird die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. In dieser lassen sich verschiedene Makromoleküle auftrennen. Wird eine elektrische Spannung an das Gel gelegt, so wandern die Moleküle der eingebrachten Proben entsprechend ihrer Größen und Ladungen zur Anode bzw. Kathode. Mittels geeigneter Färbungen können sie anschließend im Gel nachgewiesen werden. Im Falle der hier nachzuweisenden DNA-Fragmente wurde Ethidiumbromid benutzt. Dieser kanzerogene Stoff interkaliert mit den aromatischen Ringsystemen der Nukleotide und leuchtet unter UV-Licht orange.

Zur Herstellung des Agarosegels werden zu 98 ml aqua dest. 2 ml TAE-Puffer gegeben. Dieser Lösung fügt man 1,5 g Agarose hinzu. Anschließend wird sie in einem Erlenmeyerkolben zum Sieden gebracht. Das verdunstete Wasser wird ersetzt und die Lösung mit 10 µl Ethidiumbromid [1 mg/ml] versetzt. Während die Lösung abkühlt, härtet sie zu einer flexiblen Gelplatte aus. Zuvor wurde ein Kamm in die Gussform eingestellt, der nach Aushärtung entfernt wird. In die verbleibenden Kammern kann man die Proben einbringen.

Zu je 22,5 µl der nachzuweisenden DNA-Fragmente wird je 2,5 µl Loading-Buffer pipettiert. Dieser Loading-Buffer komigiert im Agarosegel entsprechend einer DNA mit etwa 50 bp. So lässt sich der Füllungszustand der Geltaschen kontrollieren und das Laufverhalten der Banden verfolgen.

Parallel wird in eine der Geltaschen ein Marker (Φ x 174 HAE III) pipettiert. Mit Hilfe seiner standardisierten Banden ist eine Einordnung der nachzuweisenden Banden gemäß der Anzahl ihrer Basenpaare möglich.

Nachdem die einzelnen Proben in die vorgeformten Kammern gegeben worden sind, wird für 45 min eine Spannung von 100 V an die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die DNA-Fragmente durchwandern das Gel (☉ Abb. 3-1).

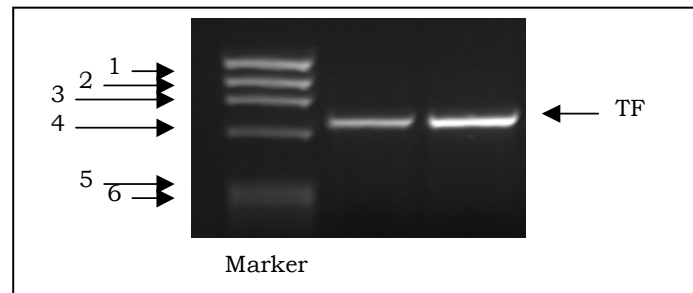


Abb. 3-1

Beispielabbildung eines Agarosegels.

Links: Referenzbanden des Markers Φ x 174 HAE III auf dem Agarosegel

Bande Nr. 3 entspricht 603 Basenpaare

Bande Nr. 4 entspricht 873 Basenpaare

Rechts: TF-Fragment (enthält 726 Basenpaare)

Im Anschluss erfolgt die Beleuchtung des Gels mit UV-Licht, und das Gel mit den orange leuchtenden Banden wird photographiert.

3.5.6 Auswertungsprinzip der PCR

Die Auswertung der Banden erfolgt mit dem Programm „BioDocAnalyse“ von Biometra. Hiermit ist es möglich, die Intensität der Banden in relativen Einheiten zu messen.

Die nachfolgenden rechnerischen Schritte werden anschließend notwendig, um die von Versuch zu Versuch teilweise deutlich variierenden Intensitäten vergleichen zu können. Diese Intensitätsschwankungen resultieren aus unterschiedlichen RNA-Gehalten der einzelnen Versuche. Zunächst wurde die RNA-Konzentration in den unbehandelten Monozyten der Kontrollgruppe ermittelt. Diese lag durchschnittlich bei 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Sämtliche Ergebnisse der Probenreihen wurden mittels Mul-

Multiplikation mit einem individuellen Faktor auf diese 25 µg/ml normiert. Alle zu Versuchende gemessenen Intensitäten der PCR-Banden wurden ebenfalls mit diesem Faktor der jeweiligen Versuchsreihe multipliziert. Die einzelnen Versuche sind somit in Bezug auf die Intensitäten der PCR-Banden unabhängig von der Menge der eingesetzten mRNA und direkt vergleichbar. Dies wäre bei Verwendung der absolut gemessenen Volumeneinheiten nicht möglich.

3.6 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse / FACScan)

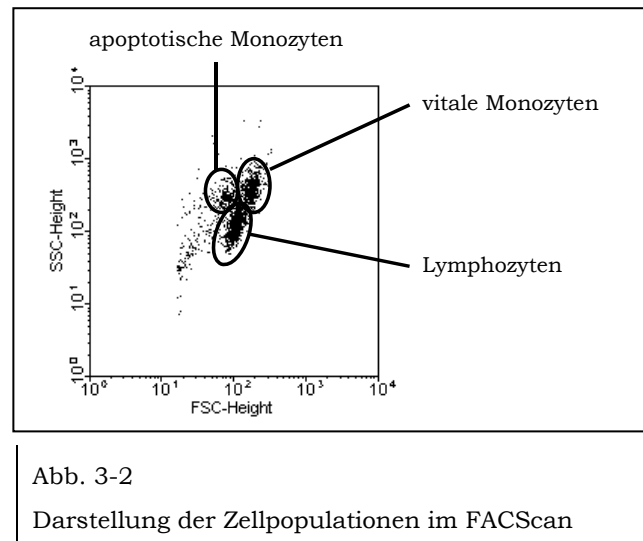
3.6.1 Prinzip der FACS-Analyse

Die FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von intrazellulären Proteinen oder Oberflächenmolekülen. Außerdem können Aussagen über Zellgröße und Binnenstruktur getroffen werden und so z.B. Leukozytensubpopulationen differenziert werden.

Die Zellen werden zunächst mittels eines Hüllstroms hydrodynamisch fokussiert und strömen dann an einem monochromatischen Laserstrahl (Argonlaser 488 nm) vorbei. Das Laserlicht wird bei Auftreffen auf zelluläre Strukturen gestreut und die Streustrahlung von Photodetektoren registriert. Die Aufteilung in Vorwärts- (FSC) bzw. Seitwärtsrichtung (SSC) lässt Rückschlüsse auf Zellgröße und Granularität des Zytoplasmas zu, wodurch die Zellen differenziert werden können (z.B. Lymphozyten von Monozyten, ☉ Abb. 3-2).

Werden Zellmoleküle gezielt mittels eines spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpers behaftet, so kann man eine quantitative Aussage über die Menge des markierten Moleküls treffen. Die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffs werden durch Anregung des Lasers auf ein höheres Energieniveau gehoben. Die beim Rückfall auf das Ursprungsniveau

emittierten Photonen werden detektiert. Deren Anzahl ist proportional zur Menge des gebundenen Antikörpers in der Zelle.



Jeder Fluoreszenzfarbstoff besitzt ein spezifisches Emissionsmaximum. Die in dieser Arbeit eingesetzten Farbstoffe sind zum einen das Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) und das Phytoerythrin (PE) mit Emissionsmaxima bei 519 bzw. 650 nm.

3.6.2 Markierung der Zielmoleküle für die FACS-Analyse

In dieser Arbeit haben wir den Tissue factor als Produkt bzw. das Oberflächenmolekül CD 14 als Marker der Monozyten nachgewiesen. Für die Messung müssen die Zellen zunächst fixiert werden. Es werden zu jedem Pellet 100 μ l Paraformaldehyd [4 %] pipettiert und anschließend 15 min lang bei 4 °C stehen gelassen. Dann gibt man 1 ml FACS Puffer hinzu und zentrifugiert 2 min bei 1200 rpm. Zum Entfernen des Paraformaldehyds wird der Überstand verworfen. Die Färbung der Monozyten erfolgt pro Pellet mit 2 μ l PE markiertem Antikörper gegen CD 14 und 2 μ l FITC markiertem Antikörper gegen humanen Tissue factor, beides gelöst in 96 μ l FACS-Puffer. Die

Inkubation dauert 30 min bei 4 °C. Anschließend wird erneut 1 ml FACS-Puffer hinzugefügt und 2 min bei 1200 rpm zentrifugiert, um die frei verbliebenen Antikörper auszuwaschen. Der Überstand wird entfernt und das Pellet in 0,5 ml FACS Puffer gelöst.

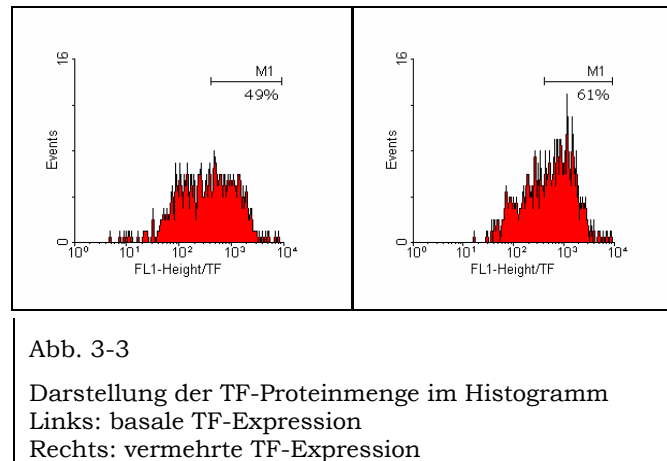
Es erfolgt nun die durchflusszytometrische Messung.

3.6.3 Auswertungsprinzip der FACS-Analyse

Da trotz mehrfacher Aufreinigung während der Zellpräparation neben vitalen Monozyten noch wenige Lymphozyten und apoptotische Monozyten in der Zellsuspension vorhanden sind, müssen zunächst die vitalen Monozyten als eigentliches Untersuchungsgut differenziert werden. Dies geschieht mit der Darstellung im FCS/SSC-Scatter. Hierbei werden die Zellen entsprechend ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) verschiedenen Populationen zugeordnet (☞ Abb. 3-2). Nun lassen sich die Monozyten problemlos erkennen. Apoptotische Monozyten und Lymphozyten werden rechnerisch (Programm: Lysis II) als Ausschuss deklariert und in der folgenden Messung nicht mit erfasst.

Während der eigentlichen Messung wird dann die Konzentration der bei 519 nm bzw. 650 nm emittierten Photonen aufgezeichnet. Die Darstellung erfolgt in einem Histogramm. Das eigentliche Interesse liegt dabei auf der Messung der Menge an Tissue factor. Der entsprechende Antikörper ist FITC-markiert. Der Oberflächenmarker CD 14 ist PE-markiert. Seine Messung dient in der späteren Auswertung einer weiteren Überprüfung der gemessenen Zelle auf die Zugehörigkeit zur Monozytenpopulation.

Graphisch wird die Tissue factor-Konzentration in einem Histogramm erfasst. Auf der Abszisse wird logarithmisch die Signalintensität und auf der Ordinate die Anzahl der zugehörigen Ereignisse aufgezeichnet (☞ Abb. 3-3).



Um die diversen Experimente miteinander vergleichen zu können wurde rechnerisch folgendermaßen vorgegangen. Im Histogramm wird die Fläche mit der Tissue factor Konzentration der Kontrolle (5 % FCS) erfasst und eine Markierung (M 1) so gesetzt, dass die Fläche in zwei Abschnitte unterteilt wird. Der prozentuale Anteil der rechten Fläche an der Gesamtfläche beträgt frei gewählt immer ca. 50 %. Diese bei der Kontrolle gesetzte Markierung wird auch bei der Auswertung der einzelnen Proben in absoluter Position beibehalten. Wird nun der prozentuale Anteil der rechten Fläche einer Probe errechnet, so verändert sich dieser je nach Lage der Probenfläche. Ist z.B. in der Probe mehr Tissue factor als in der Kontrolle, so liegt die Fläche weiter rechts auf der Abszisse. Folglich ist der prozentuale Anteil (bei stehengebliebenem Marker M 1) größer (☞ Abb. 3-3).

Es wird dann jeweils die Differenz zur Kontrolle ermittelt und tabellarisch erfasst. So sind biologisch verschiedene Experimente hinsichtlich der prozentualen Veränderung der TF-Konzentration vergleichbar.

3.7 Aktivitätsmessung

3.7.1 Prinzip der Aktivitätsmessung

Gemessen wird die prokoagulatorische Aktivität von Tissue factor in lysierten Zellen. Dabei wird durch Zugabe von Faktor X (FX) und aktiviertem Faktor VII (FVIIa) während einer halbstündigen Inkubation zunächst die Komplexbildung von Tissue factor und Faktor VIIa (TF/FVIIa-Komplex) ermöglicht, welcher anschließend Faktor X zu Faktor Xa aktiviert. Der FXa ist in der Lage Spectrozyme® FXa zu spalten, welches ein hochspezifisches Substrat für diesen ist. Das Spaltprodukt setzt einen para-nitroanilin (pNA)-Farbstoff frei, dessen Lichtabsorption bei 405 nm gemessen werden kann.

Anhand der Extinktionswerte kann die Aktivität des Tissue factors ermittelt werden. Diese ist proportional zum umgesetzten Spectrozyme® FXa. Je höher der Extinktionswert, desto höher ist die Aktivität des Tissue factors.

3.7.2 Präparation zur Aktivitätsmessung

Verwendet wird das Set Actichrome® TF der Firma american diagnostica inc. Pro Ansatz werden 2×10^6 Zellen eingesetzt. Jedem Pellet fügt man zunächst 200 µl Triton X 0,1 % hinzu, um die Zellen zu lysieren. Mittels des im Set enthaltenen Assay Buffer werden die Proben dann auf 1:9 verdünnt (5 µl Probe + 45 µl Assay Buffer).

Zu 25 µl der verdünnten Probe pipettiert man nun 25 µl humanen Faktor VIIa und 25 µl humanen Faktor X. Anschließend lagern alle Proben 15 min bei 37 °C. Dann werden zu jeder Probe 25 µl Spectrozyme® FXa substrate hinzugegeben und erneut bei 37 °C inkubiert. Je nach Tissue factor-Aktivität färben sich die Proben unterschiedlich intensiv

gelb. Diese Reaktion stoppt man nach ca. 60 min (je nach bereits erreichter Intensität) durch Zugabe von 50 µl Eisessig. Dieser Abbruch nach visueller Kontrolle ist erforderlich, um keine außerhalb des Messbereichs des Photometers liegenden Farbtintensitäten zu erreichen.

Direkt im Anschluß erfolgt die photometrische Auswertung.

3.7.3 Auswertungsprinzip der Aktivitätsmessung

Die Intensität der Gelbfärbung jeder einzelnen Probe wird photometrisch gemessen. Bei einer Wellenlänge von 405 nm wird die Absorption durch para-nitroanilin (pNA)-Farbstoff detektiert. Die Einordnung der jeweiligen Aktivitäten erfolgt über einen Vergleich mit einer Standardkurve, die zuvor mittels bekannter TF-Aktivitäten erstellt wurde. Es ergeben sich relative Extinktionswerte zwischen 0,0 und 2,0 die anhand der Eichkurve in Aktivitätsgrade umgewandelt werden können.

Das folgende rechnerische Verfahren ermöglicht eine Vergleichbarkeit verschiedener biologischer Experimente. Der für die Kontrolle (5 % FCS) ermittelte Extinktionswert wird als Basisaktivität angesehen. Im Mittel kam es hier zu einer Aktivität von ca. 1000 pM, wobei jedoch aufgrund des visuellen Versuchabbruchs starke Schwankungen auftraten.

Zunächst wurden die Kontrollwerte aller Versuche mit einem jeweils individuellen Faktor näher an 1000 pM gebracht. Alle weiteren Ergebnisse eines Versuches wurden anschließend mit demselben Faktor multipliziert. Nur so ließ sich eine direkte Vergleichbarkeit der absoluten Aktivitäten verschiedener Versuche herstellen, da der letzte Schritt des Experimentes, die Spaltung des Spectrozyme® FXa substrate, nach visueller Kontrolle der Gelbfärbung abgebrochen wird. Dies ist eine subjektiv festgesetzte Versuchsdauer und variiert bei jedem Experiment.

4 Ergebnisse

4.1 TF-mRNA-Expression unter Einfluss von Rapamycin

Die initiale Fragestellung dieser Arbeit war, eine angenommene Beeinflussung der Tissue factor-Konzentration in humanen Monozyten durch das Immunsuppressivum Rapamycin zu beweisen.

Die Wahl fiel auf Monozyten, da sie ubiquitär im Körper vorkommen und maßgeblich an immunologischen Prozessen im Zusammenhang mit transplantierten Organen beteiligt sind.

Da eine potenzielle Zunahme von Tissue factor eine vermehrte Expression des entsprechenden Genabschnitts voraussetzt, wurde zunächst die Konzentration der TF-mRNA gemessen.

Die Größenbestimmung im Agarosegel für die erwartete Tissue factor-Bande erfolgte mittels eines Standardmarkers (Φ x 174 HAE III). Dieser enthält Fragmente mit definierten Basenpaaren und lässt somit eine Einordnung der zu untersuchenden Banden nach ihren Basenpaaren zu. TF-mRNA weist eine Länge von 726 Basenpaaren auf. Die entsprechenden Banden müssen dann zwischen dem dritten (603 BP) und vierten (873 BP) Peak des Markers liegen (☞ Abb. 3-1).

Da für die PCR ausschließlich Primer für TF verwendet wurden und auf dem Gel keine weiteren Banden zu finden waren, ist aufgrund der Einordnung gegenüber dem Marker bei den detektierten Banden von TF-mRNA auszugehen.

Bei der RNA-Präparation wurde jeweils die gleiche Menge Zellen verwendet. Trotzdem ist es nicht auszuschließen, dass sich unterschiedliche RNA-Mengen in den Versuchsansätzen befinden. Um hier eine Vergleichbarkeit herzustellen, wurde der mRNA-Level von β -Actin, einem ubiquitär vorkommenden Strukturprotein, mitbestimmt. β -Actin unterliegt keiner wesentlichen Regulation durch äußere Einflüsse. Bei Vor-

handensein gleichmässiger β -Actin Banden kann so von einer jeweils vergleichbaren RNA-Konzentration ausgegangen werden.

Veränderungen der TF-Banden sind so auf unterschiedliche mRNA-Expressionen und nicht auf Konzentrationsphänomene zurückzuführen.

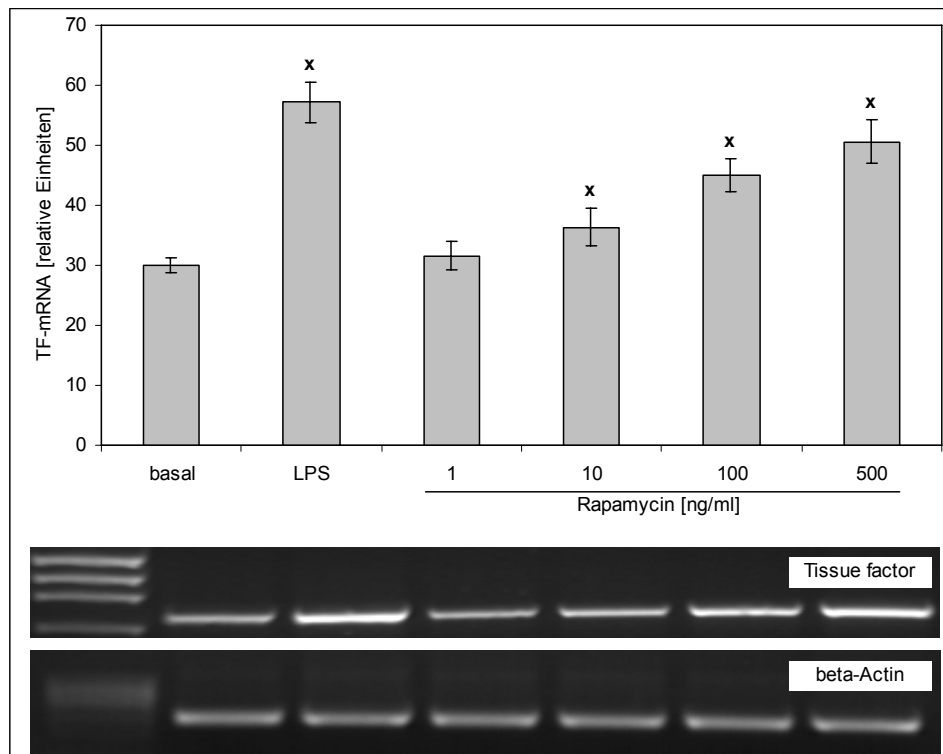


Abb. 4-1

Veränderung der TF-mRNA in Monozyten unter Einfluss von Rapamycin. Exemplarische Darstellung des Agarosegels einer semiquantitativen RT-PCR und graphische Zusammenfassung aller Versuchsergebnisse. Rapamycin steigert konzentrationsabhängig die TF-Expression. Als Referenz dienen ruhende und mit LPS stimulierte Monozyten, als basale TF-mRNA Menge werden ~ 30 rel. Einh. angesetzt ($x = p < 0,05$ gegenüber basal).

Untersucht wurde eine möglicherweise veränderte Konzentration von TF-mRNA in humanen Monozyten unter dem Einfluss von Rapamycin. Um hierbei auch eine ggf. vorhandene Dosis-Wirkungsbeziehung nachzuweisen, wurden die Monozyten mit unterschiedlichen Mengen an Rapamycin von 1, 10, 100 und 500 ng/ml stimuliert. Als Referenzwert diente die basale Expression in unstimulierten Monozyten. Da eine Zu-

nahme von Tissue factor unter LPS-Stimulation bekannt ist, wurde ein solcher Ansatz in jeder Versuchsreihe als Positivkontrolle verwendet.

Die basale Tissue factor-Expression der Monozyten in 5 % FCS lag durchschnittlich bei ca. 30 relativen Einheiten. Die Positivkontrolle mit LPS-stimulierten Monozyten ergab eine durchschnittliche Steigerung der TF-Menge um 90 % auf etwa 57 relative Einheiten.

Mit zunehmender Konzentration an Rapamycin im Nährmedium zeigte sich eine gleichsinnige Veränderung der TF-mRNA Expression. Bei Stimulation mit 10 ng/ml Rapamycin, was der wirksamen Plasmakonzentration in vivo entspräche, kam es zu einem Anstieg um durchschnittlich 21 % (36,4 rel. Einh.). Die im Versuch höchste zugesetzte Menge betrug 500 ng/ml und führte zur stärksten rapamycininduzierten Zunahme der Tissue factor-mRNA Expression (69 %).

Sie lag nur wenig unter der von LPS-stimulierten Monozyten.

War bei Zusatz von 1 ng/ml Rapamycin noch kein signifikanter Anstieg zu verzeichnen, so war diese Signifikanz (x) ab 10 ng/ml Rapamycin in allen weiter zunehmenden Konzentrationen vorhanden.

4.2 TF-Proteinkonzentration unter Einfluss von Rapamycin

Nachdem eine Zunahme der mRNA von Tissue factor unter Rapamycin zu verzeichnen war, stellte sich die Frage, ob diese auch in ein vermehrtes Vorkommen von Tissue factor-Protein mündet.

Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung (FACS) wurde der Proteingehalt an Tissue factor gemessen. Wiederum wurden Monozyten mit aufsteigenden Rapamycindosen inkubiert (1, 10, 100 und 500 ng/ml).

Mittels eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers gegen TF-Protein konnte der Nachweis von vorhandenem TF erbracht werden. Diese Methode erfaßt lediglich den an der Außenseite der Monozyten exprimierten Tissue factor.

Es kann keine Aussage über den intrazellulären Gehalt und somit über die gesamte zelluläre TF-Konzentration getroffen werden, hierzu wäre eine Lyse der Zellen nötig gewesen. Hierauf wurde verzichtet, da in vivo nur die extrazellulären TF-Moleküle eine koagulatorische Bedeutung haben dürften. Eine extrazellulär gefundene Konzentrationsänderung könnte biologische Relevanz haben.

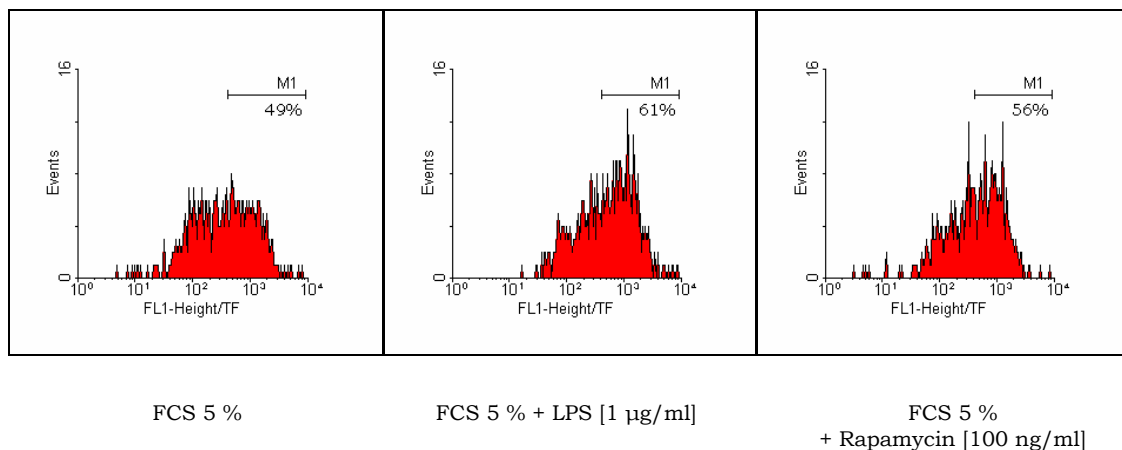


Abb. 4-2

Beispielabbildung des FACScans auf TF-Protein.

Um prozentuale Mengenänderungen von TF ein beide Richtungen zu erfassen, wird die basale Proteinmenge mir ca. 50 % gemittelt. Im Vergleich dazu die Veränderung nach Stimulation der humanen Monozyten mit LPS bzw. Rapamycin.

Die Versuchsergebnisse bestätigen den bereits auf mRNA-Ebene gezeigten Zuwachs von Tissue factor unter Stimulation mit Rapamycin. Bei unstimulierten Monozyten wurde der Marker für die basale TF-Konzentration willkürlich in die Mitte, d.h. ca. 50 % entspr. 0,5 gelegt. Von hier aus wurde dann ein Zuwachs bzw. eine Abnahme durch Veränderung Richtung 0 % oder 100 % registriert.

Der Zusatz von 1 ng/ml Rapamycin zur Nährlösung führte zu einer Zunahme der Proteinmenge um 6 % gegenüber den unstimulierten Monozyten. Nach Stimulation mit 100 ng/ml Rapamycin ist ein Anstieg der Tissue factor-positiv gemessenen Zellen um 14 % zu verzeichnen. Auch in diesem Versuch ist die maximal zugesetzte Rapamycinkonzentration

von 500 ng/ml diejenige, die zur stärksten Erhöhung der TF-Konzentration führt (um 19 % gegenüber der Kontrolle).

Wie bei den Ergebnissen der PCR ist ab einer Rapamycinkonzentration von 10 ng/ml ein signifikanter Anstieg (x) zu sehen. Trotzdem bleibt auch hier die durch LPS-Stimulation erzielte TF-Zunahme durch Zugabe hoher Rapamycin Mengen unerreicht.

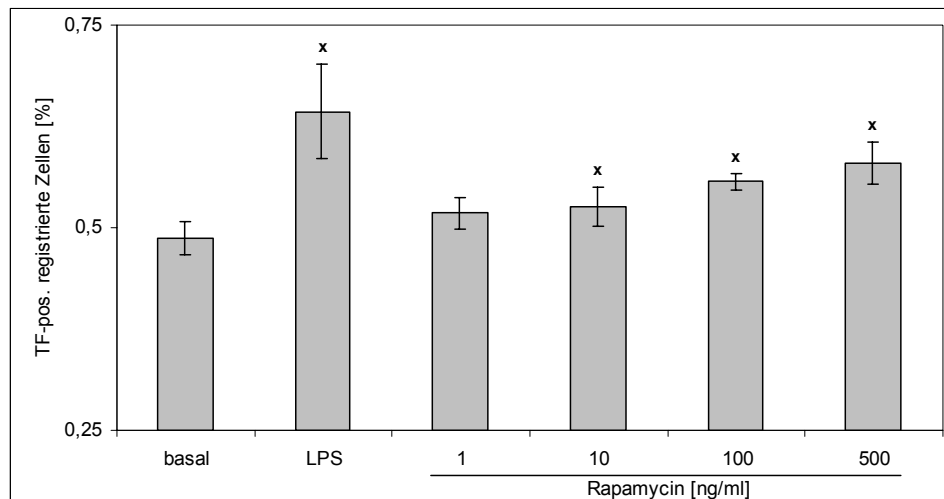


Abb. 4-3

Veränderung der Proteinkonzentration von TF in Monozyten unter Einfluss von Rapamycin.

Zusammenfassende graphische Darstellung aller Versuchsergebnisse.

Rapamycin steigert konzentrationsabhängig die TF-Synthese.

Als Referenz dienen ruhende und mit LPS stimulierte Monozyten, die basale TF-Proteinmenge wird mit ~ 0,5 angegeben (x = $p < 0,05$ gegenüber basal).

Auffallend ist, dass der extrazelluläre Anstieg der TF-Protein Menge prozentual deutlich hinter den Steigerungsraten der TF-mRNA zurückbleibt.

4.3 Aktivität von TF unter Einfluss von Rapamycin

Nachdem eine Zunahme der Tissue factor Expression auf mRNA- und Proteinebene gezeigt war, galt es zu klären, ob diese vermehrte Expression auch mit einer Zunahme der prokoagulatorischen Aktivität verbunden ist. Hierzu wurde die gleiche Versuchsreihe wie bei der

mRNA-Messung verwendet. Auf die Rapamycinkonzentration 1 ng/ml wurde verzichtet, da es hierbei zu keiner signifikanten Zunahme von Tissue factor kam.

Es fand sich auch hier eine positive Korrelation zwischen Rapamycinkonzentration im Nährmedium und der Aktivität des Tissue factors. Je höher die Konzentration des zugesetzten Rapamycins, desto stärker die TF-Aktivität. Bereits bei einer Konzentration von 10 ng/ml Rapamycin zeigte sich eine signifikante (x) Aktivitätszunahme um 63 % auf 1300 pM gegenüber der mittleren basalen Aktivität von 1000 pM. Die maximale Rapamycinkonzentration von 500 ng/ml zeigte einen Anstieg um 64 %.

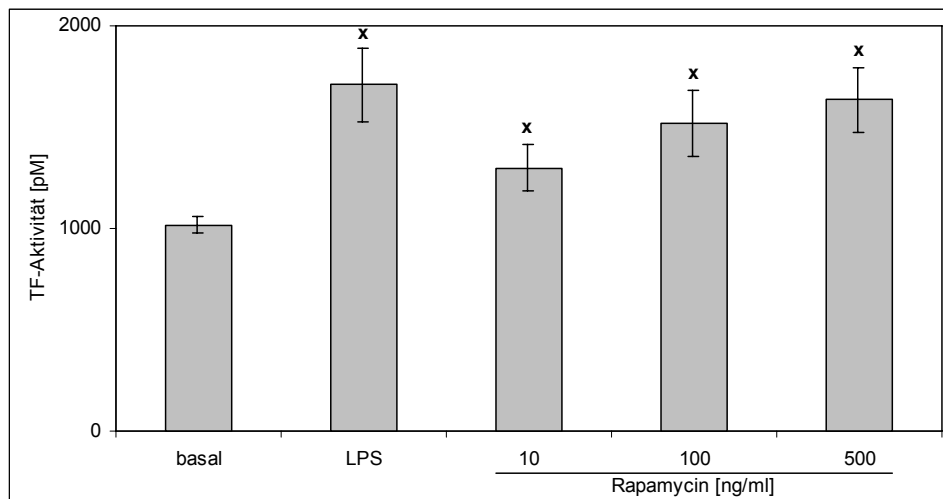


Abb. 4-4

Veränderung der Aktivität von TF in Monozyten unter Einfluss von Rapamycin.

Zusammenfassende graphische Darstellung aller Versuchsergebnisse.

Rapamycin steigert konzentrationsabhängig die TF-Aktivität.

Als Referenz dienen ruhende und mit LPS stimulierte Monozyten, die basale TF-Aktivität wird mit ~ 100 % angegeben (x = $p < 0,05$ gegenüber basal).

Ähnlich der Ergebnisse der mRNA-Messung wurde auch hier der durch LPS induzierbare Anstieg bei maximaler Rapamycinkonzentration fast erreicht.

Aufgrund des vorgegebenen Versuchsaufbaus des verwendeten Fertigkits erfolgt vor der Aktivitätsmessung eine Lyse der Zellen. Somit fließen alle innerhalb und außerhalb der Monozyten vorhandenen TF-Moleküle in

die Aktivitätsmessung ein. Eine selektive Aussage über die Aktivität extrazellulär exprimierten Tissue factors, wie in der FACS-Analyse bestimmt, kann nicht getroffen werden.

4.4 TF-mRNA-Expression unter Einfluss von IL-4

Im folgenden Versuch wurden die Auswirkungen von Interleukin 4 (IL-4) in Kombination mit Rapamycin auf mRNA-Ebene untersucht. IL-4 ist ein von Th2-Zellen produziertes Zytokin und wirkt inhibitorisch auf die TF-Produktion von Monozyten ein.

Es wurden zwei parallele Versuchsreihen erstellt. Die erste enthielt neben einer Kontrollgruppe aus unstimulierten Monozyten eine Positivkontrolle mit LPS-stimulierten Zellen sowie eine Gruppe von Monozyten, die mit 100 ng/ml Rapamycin stimuliert wurden. Die zweite Versuchsreihe enthielt die oben genannten Gruppen, wobei allen jeweils IL-4 in einer Konzentration von 10 U/ml zugesetzt wurde. Da aufgrund der Daten aus PCR und FACS die dosisabhängige Steigerung der TF-Konzentration bereits bekannt war, wurde auf eine solche Konzentrationsreihe mit IL-4 Zusatz verzichtet und Rapamycin nur in einer Dosis von 100 ng/ml verwendet.

Die Ergebnisse der Gruppe ohne IL-4 waren erwartungsgemäß ähnlich der bereits oben genannten. Der Anstieg der TF-Expression unter Rapamycin [100 ng/ml] betrug 53 % gegenüber der Kontrolle, der unter Stimulation mit LPS [1 µg/ml] 79 %. Nach Zusatz von IL-4 zeigte sich eine deutliche Suppression von Tissue factor. Die basale TF-Expression unter IL-4 beträgt nur ca. $\frac{1}{5}$ (5,7 rel. Einh.) der Expression gänzlich unstimulierter Monozyten. Auf entsprechend niedrigem Niveau wird TF auch in mit LPS bzw. Rapamycin behandelten Zellen unter Zusatz von IL-4 exprimiert (15,8 bzw. 14,0 rel. Einh.).

Die Relationen innerhalb der mit IL-4 versetzten Gruppe differieren jedoch deutlich von denen ohne IL-4. So ist hier nach Zugabe von

100 ng/ml Rapamycin ein Anstieg von 145 % gegenüber der Kontrolle zu verzeichnen. Dies ist eine etwa dreifach höhere Steigerung der Tissue factor-Expression, als sie ohne IL-4 zu verzeichnen war. Auch unter LPS Einfluss ist eine deutlichere Zunahme zu erkennen, als dies ohne IL-4 beobachtet wurde.

Insgesamt ist aber in beiden Gruppen von den verwendeten Stimulanzien LPS der stärkere Induktor, wobei auch Rapamycin zu einer deutlichen Zunahme von TF-mRNA führt. Die gemessenen Werte unterscheiden sich in allen Versuchen signifikant (x) von denen der unstimulierten Monozyten.

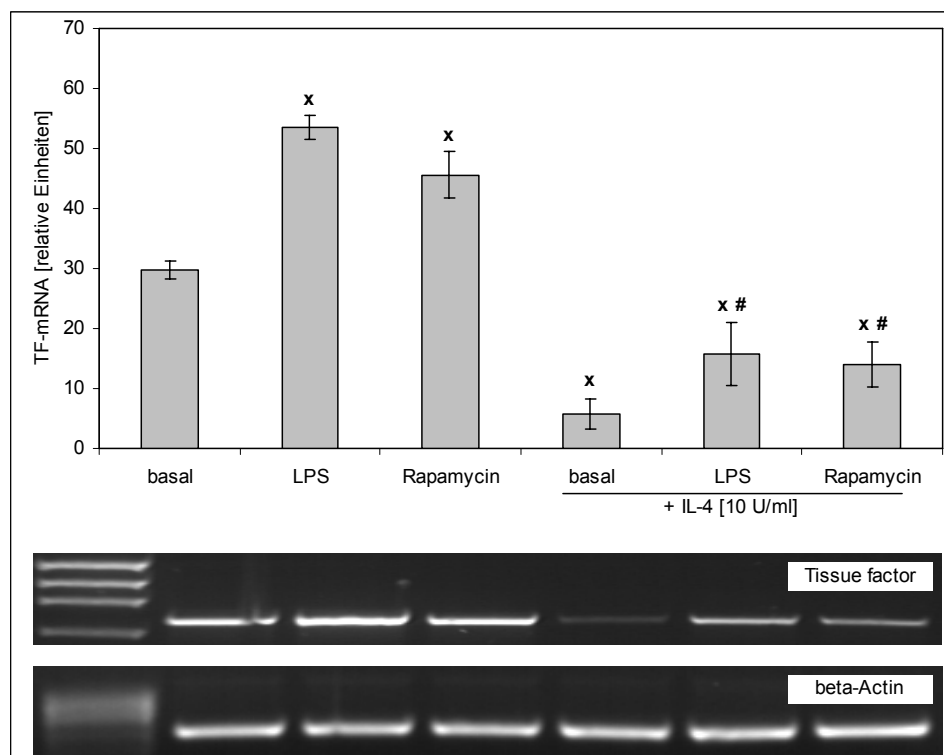


Abb. 4-5

Veränderung der TF-mRNA in Monozyten unter Einfluss von Rapamycin und Interleukin 4.

Exemplarische Darstellung des Agarosegels einer semiquantitativen RT-PCR und graphische Zusammenfassung aller Versuchsergebnisse.

IL-4 supprimiert, Rapamycin steigert die TF-Expression.

Als Referenz dienen jeweils ruhende und mit LPS stimulierte Monozyten, als basale TF-mRNA Menge werden ~ 30 rel. Einh. angesetzt

(x = $p < 0,05$ gegenüber basal, # = $p < 0,05$ gegenüber basal + IL-4).

Eine Signifikanz der TF-Zunahme unter Rapamycin [100 ng/ml] und LPS [1 µg/ml] im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle zeigt sich sowohl innerhalb der mit IL-4 (#) als auch in der ohne IL-4 (x) behandelten Versuchsreihe.

4.5 TF-Proteinkonzentration unter Einfluss von IL-4

Es liegt nahe, dass eine Abnahme der mRNA-Menge von Tissue factor auch zu einer gleichsinnigen Veränderung der Proteinkonzentration führt. Um dies auch zu zeigen, wurde eine FACS-Analyse für TF bei einem gleichartigen Versuchsaufbau mit IL-4 Zusatz wie für die PCR durchgeführt.

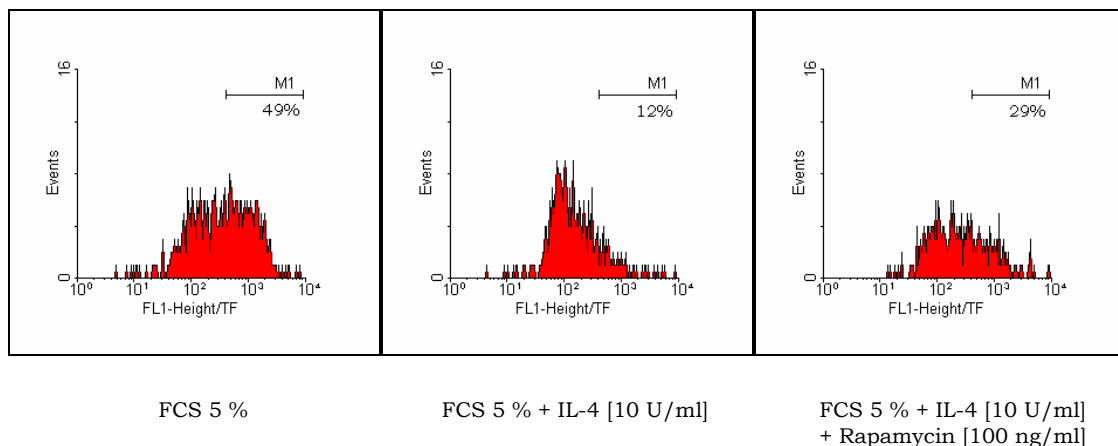


Abb. 4-6

Beispielabbildung des FACScans auf TF-Protein.

Um prozentuale Mengenänderungen von TF ein beide Richtungen zu erfassen, wird die basale Proteinmenge mit ca. 50 % gemittelt. Im Vergleich dazu die Veränderung nach Stimulation der Monozyten mit Interleukin 4 allein und in Kombination mit Rapamycin.

Die Steigerungsraten der Proteinexpression bei alleiniger Stimulation mit Rapamycin [100 ng/ml] und LPS [1 µg/ml] im Vergleich zu unbehandelten Monozyten sind ähnlich denen aus obigem Versuch (13,0 % bzw. 25 %).

Deutlich sind die Konzentrationsabnahmen unter Zusatz von IL-4. So ist die basale Expressionsrate um 73 % reduziert. Nach Stimulation mit Rapamycin ist noch eine fast 70 %ige Reduktion des TF-Proteins zu messen.

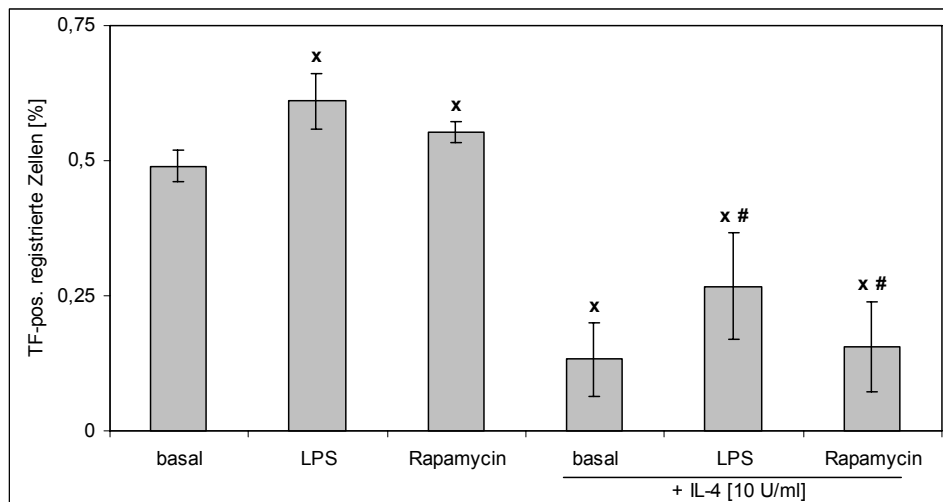


Abb. 4-7

Veränderung der TF-Proteinkonzentration in Monozyten unter Einfluss von Rapamycin und Interleukin 4.
 Zusammenfassende graphische Darstellung aller Versuchsergebnisse.
 IL-4 supprimiert, Rapamycin steigert die TF-Synthese.
 Als Referenz dienen jeweils ruhende und mit LPS stimulierte Monozyten, die basale TF-Proteinmenge wird mit ~ 0,5 angegeben
 (x = $p < 0,05$ gegenüber basal, # = $p < 0,05$ gegenüber basal + IL-4).

Insgesamt betrachtet führt IL-4 zu einer deutlichen Suppression der extrazellulären TF-Proteinmenge. Die Konzentrationsverhältnisse innerhalb der mit IL-4 behandelten Monozytenreihen sind aber vergleichbar mit den Ergebnissen der nicht stimulierten Zellen. So führt die Zugabe von Rapamycin zu einer geringeren TF-Suppression als bei unstimulierten Monozyten (nur IL-4), und die mit LPS behandelten Zellen zeigen die geringste Reduktion von Tissue factor.

4.6 Aktivität von TF unter Einfluss von IL-4

Um die bislang erhaltenen Daten zum Einfluss von IL-4 auf die Expression von Tissue factor zu vervollständigen, wurde noch die Aktivität des TF unter IL-4 gemessen. Die Annahme, dass es entsprechend der Reduktion von mRNA und Protein auch zu einer Abnahme des Aktivitätsniveaus kommen würde, ließ sich bestätigen.

So ist die basale Aktivität von TF in Monozyten nach Stimulation mit IL-4 im Mittel um 78 % gesunken. Unter Rapamycinzusatz ist die Aktivitätsabnahme geringer (- 65 %), was entsprechend den Daten der PCR- und FACS-Analyse auch zu erwarten war.

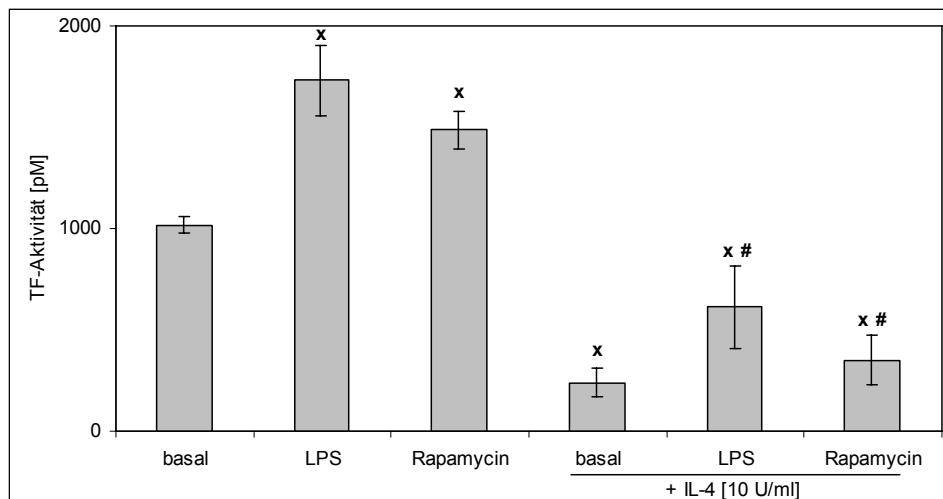


Abb. 4-8

Veränderung der Aktivität von TF in Monozyten unter Einfluss von Rapamycin und Interleukin 4.

Zusammenfassende graphische Darstellung aller Versuchsergebnisse.

IL-4 reduziert die TF-Aktivität, Rapamycin und LPS reduzieren den inhibierenden Effekt.

Als Referenz dienen ruhende Monozyten, die basale Aktivität des TF wird mit ~ 100 % angegeben (x = $p < 0,05$ gegenüber basal, # = $p < 0,05$ gegenüber basal + IL-4).

Die starke Aktivitätszunahme unter LPS Einfluss (Monozyten ohne IL-4) spiegelt sich hier in der geringeren Abnahme unter IL-4 (- 39 %) wieder. Auch bei der Aktivitätsmessung sind die Veränderungen gegenüber der basalen Aktivität signifikant (x bzw. #).

4.7 TF-mRNA-Expression unter Einfluss von Calphostin

Nachdem eine Zunahme der TF-Expression unter Einfluss von Rapamycin nachgewiesen war, stellte sich die Frage, über welche Signalkaskade diese Induktion bewirkt wird. Es ist bekannt, dass der Proteinkinase C (PKC) eine wichtige Rolle bei der Regulierung der TF-Expression zukommt [18] [92].

Es wäre denkbar, dass diese Kinase auch bei der hier beobachteten Stimulierung beteiligt ist. Als Beweis wurde ein Hemmstoff der Proteinkinase C, das Calphostin, eingesetzt. Calphostin ist ein selektiver Hemmstoff der PKC. Das Ausbleiben der vermehrten TF-Expression unter seinem Einfluss wäre ein Beweis für eine Beteiligung am Reaktionsweg.

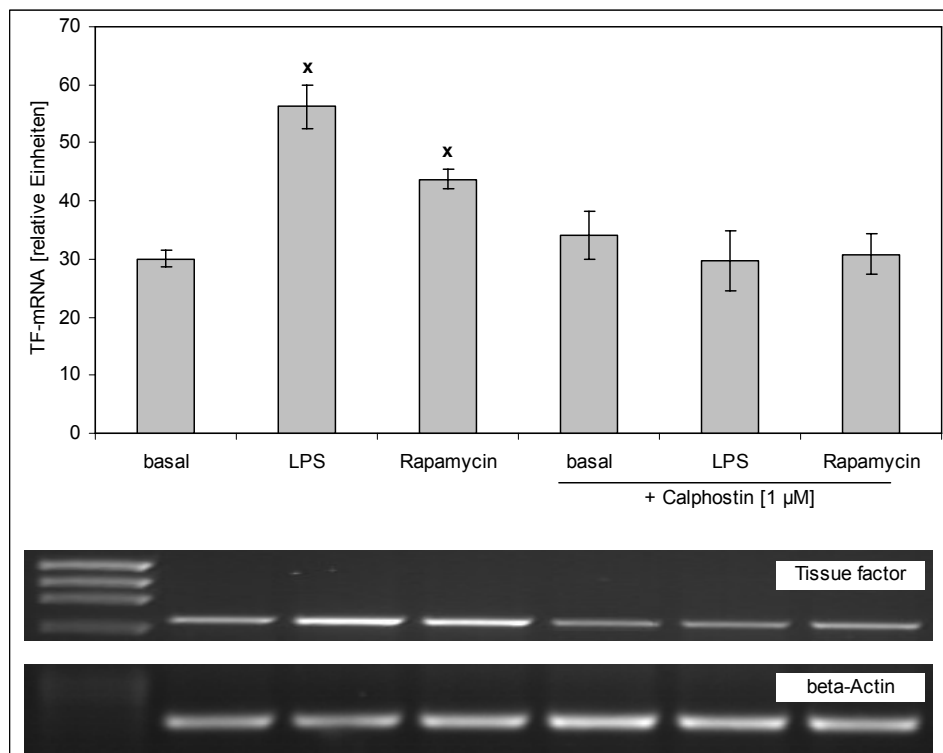


Abb. 4-9

Veränderung der TF-mRNA in Monozyten unter Einfluss von Rapamycin und Calphostin.

Exemplarische Darstellung des Agarosegels einer semiquantitativen RT-PCR und graphische Zusammenfassung aller Versuchsergebnisse.

Calphostin supprimiert die TF-Expression.

Als Referenz dienen jeweils ruhende und mit LPS stimulierte Monozyten, die basale TF-mRNA wird mit ~ 100 % angegeben (x = $p < 0,05$ gegenüber basal).

Nach Zugabe von 1 μM Calphostin zu den mit LPS bzw. Rapamycin stimulierten Monozyten wurde die Konzentrationsänderung von TF-mRNA untersucht.

Dabei zeigte sich, dass es nach Zusatz von Calphostin zu keiner messbaren Veränderung kam. Weder Rapamycin noch LPS vermochten unter Calphostineinfluss die TF-mRNA-Konzentration über das basale Niveau hinaus zu steigern. Eine Veränderung in ruhenden Monozyten findet offenbar nicht statt, da auch die basale Expression keiner Veränderung unterlegen war.

4.8 TF-mRNA-Expression unter Einfluss von DOG

Dass in die Induktion von TF in humanen Monozyten durch Rapamycin die Proteinkinase C involviert ist, wurde bereits gezeigt. Mit dem Stoff 1,2-Dioctanoyl-sn-glycerol (DOG) ist es möglich, die PKC direkt zu aktivieren.

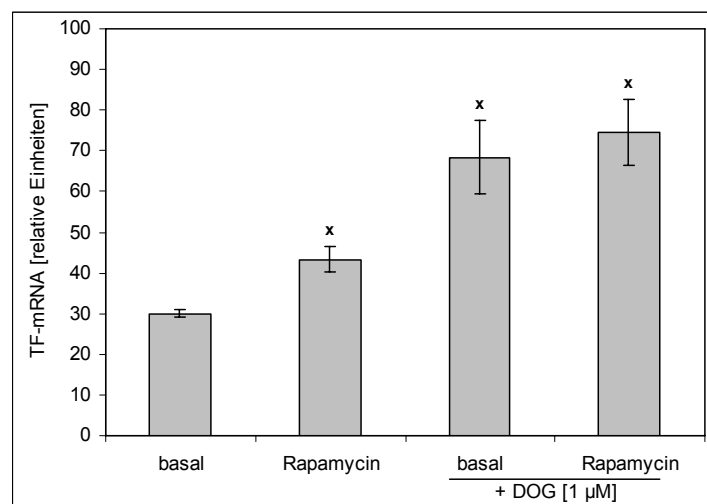


Abb. 4-10

Veränderung der TF-mRNA in Monozyten unter Einfluss von Rapamycin und DOG.

Zusammenfassende graphische Darstellung aller Versuchsergebnisse.

DOG aktiviert die TF-Expression, Rapamycin führt zu einer weiteren, jedoch nicht signifikanten Steigerung. Als Referenz dienen ruhende Monozyten, die basale TF-mRNA wird mit ~ 100% angegeben (x = $p < 0,05$ gegenüber basal).

Um das Ergebnis aus dem Hemmversuch zu bestätigen, erfolgte noch die Inkubation der Monozyten mit DOG. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Zunahme des TF-mRNA-Gehalts unter Zugabe von DOG. Bereits die basale Expressionsrate unter DOG-Einfluss ist mit 68,4 relativen Einheiten um mehr als das Doppelte gesteigert gegenüber ruhenden Monozyten. Die Zugabe von Rapamycin steigert den Zuwachs nur mehr geringfügig (74,5 rel. Einh.). Die Veränderung zwischen den mit DOG allein und den mit DOG plus Rapamycin stimulierten Zellen ist nicht signifikant.

4.9 Ergebniszusammenfassung

Stimuliert man humane Monozyten in-vitro mit dem Immunsuppressivum Rapamycin in zunehmender Konzentration, so kommt es dosisabhängig zu einer Zunahme der mRNA von Tissue factor. Bereits ab einer Konzentration von 10 ng/ml Rapamycin, was in etwa dem wirksamen Plasmaspiegel entspricht, ist ein signifikanter Anstieg der mRNA zu beobachten. Betrachtet man die Proteinkonzentrationen, so sind auch hier gleichsinnige Veränderungen messbar. Wie auf mRNA-Ebene findet sich auch eine von der Rapamycinkonzentration abhängige Steigerung von TF-Protein auf der Oberfläche der Monozyten. Mittels einer Aktivitätsmessung konnte gezeigt werden, dass dieses auch für eine Gerinnungsaktivierung relevant sein könnte.

Inkubiert man die Monozyten parallel zu Rapamycin noch mit dem antiinflammatorischen Zytokin Interleukin 4, so führt dies zu einer Reduktion der TF-Expression. Dies konnte für alle drei Ebenen (mRNA, Protein, Aktivität) gezeigt werden. Es wird ebenfalls deutlich, dass die konzentrationssteigernde Wirkung von Rapamycin dabei jedoch nicht verloren geht. So ist die Abnahme von z.B. der mRNA-Menge unter IL-4 und Rapamycin deutlich geringer als unter IL-4 alleine. Auch bei Betrachtung der Proteinkonzentrationen und der Aktivitäten ist ein solches Verhalten nachweisbar.

Im intrazellulären Signalweg spielt die Proteinkinase C eine wichtige Rolle, denn unter Einfluss des selektiven PKC-Hemmstoffs Calphostin sind die oben beschriebenen Veränderungen der TF-Expression unterdrückbar.

5 Diskussion

Nach der Transplantation eines Fremdorgans muss das Immunsystem des neuen Wirts so modelliert werden, dass es das Spenderorgan nicht abstößt. Nur so ist ein langfristiger Erhalt der Organfunktion zu realisieren. Zu diesem Zweck sind eine Reihe von Medikamenten entwickelt worden, u.a. Immunsuppressiva. Hierunter fallen Calcineurininhibitoren wie z.B. Cyclosporin oder Hemmer der mTOR wie das neuere Rapamycin. Wenn auch über verschiedene Wege, so ist das gemeinsame Ziel dieser Wirkstoffe eine Inhibierung des Immunsystems. Nur so ist es möglich, ein Organ mit vom neuen Wirt differenten Oberflächenantigenen in „feindlicher“ Umgebung zu erhalten.

Bei der Nierentransplantation gewinnt Rapamycin an Bedeutung. So kommt es Studien zufolge zu einer Abnahme von Abstoßungsreaktionen nach allogenen Nierentransplantationen bei Verwendung von Rapamycin [96;71], insbesondere im Hinblick auf das Langzeitüberleben [67;49].

Wie alle Medikamente verursachen jedoch auch Immunsuppressiva unerwünschte Nebenwirkungen. Beschrieben sind u.a. Hyperlipoproteinämie, Hypertriglyceridämie, Hypokaliämie, Arthralgien und Blutbildveränderungen. Die Veränderungen im Fettstoffwechsel seien hiernach die am häufigsten anzutreffenden Nebenwirkungen. Eine Dosisreduktion kann hier abhelfen [71].

Schwerwiegende Probleme durch Wundheilungsstörungen werden ebenfalls unter einer immunsuppressiven Therapie mit Rapamycin, u.a. nach Nieren- oder Lebertransplantationen, beobachtet [19;36].

Einflüsse auf die Blutgerinnung sind für viele Immunsuppressiva beschrieben. Es ist bekannt, dass z.B. Cyclosporin A ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung von thrombotischen Komplikationen sein kann [101;50].

Organtransplantierte Patienten sind für derartige Komplikationen besonders gefährdet. Hier spielen die Immunsuppressiva eine bedeutende Rolle für das Auftreten von thrombotischen Ereignissen [50], die bis zum Verlust des transplantierten Organs führen können. Neben der medikamentösen Therapie gibt jedoch vielfältige andere Gründe.

Wenn Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz sich einer Nierentransplantation unterziehen, so finden sich bei diesen u.a. aufgrund der urämischen Situation häufig begleitende hämostasiologische Besonderheiten hinsichtlich einer koagulatorischen Diathese. Diese werden durch das chirurgische Trauma und durch Einflüsse der postoperativen Phase wie Immobilisation oder Veränderungen der Blutviskosität aggraviert. Transplantatempfänger mit angeborener oder erworbener Blutgerinnungsneigung sind hier besonders gefährdet. So konnten Heidenreich et al. in einer prospektiven Studie zeigen, dass es bei Patienten mit z. B. Faktor V-Leiden oder einem Mangel an Protein C oder S etwa doppelt so häufig zu einem Transplantatverlust kommt als ohne Vorhandensein dieser Faktoren [41;42]. Dabei konnte in einem Großteil der Fälle lichtmikroskopisch eine thrombotische Ursache ermittelt werden [40].

Dass es möglicherweise zu Veränderungen in der prokoagulatorischen Aktivität auch unter einer immunsuppressiven Therapie mit Rapamycin kommt, lassen u.a. Fallberichte vermuten. In einem Übersichtsartikel über Inzidenz und Risikofaktoren thrombotischer Komplikationen nach Nierentransplantationen in den USA wird der initiale Einsatz von Rapamycin als unabhängiger Risikofaktor gewertet [75].

Saikali et al. berichten über eine Patientin, die nach Wechsel des immunsuppressiven Regimes auf Rapamycin in Kombination mit Tacrolimus glomeruläre Mikrothromben entwickelte, welche zum erneuten Wirkstoffwechsel zwangen [81]. Barone et al. veröffentlichten einen Fallbericht, in dem es zu thrombotischen Komplikationen unter alleiniger Therapie mit Rapamycin kam [9]. Rapamycintherapie nach

simultaner Transplantation von Niere und Pankreas führt ebenfalls vereinzelt zu venösen Thromben [86].

Es sind Fälle berichtet worden, bei denen es unter Cyclosporintherapie zu thrombotischen Mikroangiopathien gekommen war, die dann nach Regimewechsel zu Rapamycin fortbestanden oder sich sogar verschlechterten [76]. Fortin et al. fanden in ihrer Studie sogar die höchste Inzidenz für thrombotische Mikroangiopathie in der Gruppe, welche mit der Kombination Cyclosporin und Rapamycin behandelt wurde [30].

Entgegen den Berichten obiger Autoren findet sich auch Literatur, nach der Rapamycin nicht als Risikofaktor für thrombembolische Komplikationen gesehen wird. Ähnlich wie die Gruppe um Fortin untersuchten bereits ein Jahr zuvor Langer et al. die Auswirkungen der Therapiekombination Cyclosporin und Rapamycin auf mögliche Thrombosen. Sie konnten keine Zunahme thrombembolischer Ereignisse im Vergleich mit der Gruppe Cyclosporin ohne Rapamycin finden. Auch gibt es Fallberichte, nach denen eine unter immunsuppressiver Therapie entstandene thrombotische Mikroangiopathie nach Wechsel zu Rapamycin sistierte bzw. sich sogar zurückbildete [26].

Diesen Artikeln zufolge lässt sich nicht klären, ob Rapamycin einen Einfluss auf die Bildung von Thromben hat, sei es als Nebenwirkung bei alleiniger Gabe oder in Kombination mit anderen Medikamenten.

Spiros et al., die über ein erhöhtes Risiko von thrombembolischen Komplikationen unter Rapamycintherapie berichteten, schließen aus ihrer Studie, dass Antikoagulation der effektive therapeutische Schritt zur Behandlung dieser Thrombosen sei [86]. Dem Wirkstoff Acetylsalicylsäure (ASS) wird hierbei ein hoher Nutzen zugeschrieben.

ASS acetyliert die Cyclooxygenase I (COX I) und inhibiert so u.a. die Bildung von Thromboxan A₂, welches die Thrombozytenaggregation initiiert. Es ist bekannt, dass Rapamycin diese Aggregation fördert, ähnlich wie Cyclosporin [6]. Jedoch ist die Thrombenbildung über eine

Thrombozytenaggregation eher typisch für den arteriellen Gefäßteil. Die im Rahmen von Transplantatabstoßungen gefundene thrombotische Mikroangiopathie spielt sich meist in venösen Gefäßen ab. Es liegt daher nahe, dass weitere Faktoren ursächlich sind.

Ein immer wieder diskutierter Faktor in der Entstehung von Thrombosen in Zusammenhang mit Transplantaten ist der Tissue factor (TF). TF ist der Hauptinitiator der extrinsischen Gerinnungskaskade. Dass er auch eine wichtige Rolle bei einer möglicherweise prothrombogenen Wirkung von Rapamycin spielen könnte, lässt ein Vergleich mit dem Einfluss von Cyclosporin auf die TF-Konzentration zu.

Die TF-Expression z.B. in Monozyten steht unter transkriptionaler Kontrolle. Dabei kommt einer Serin/Threonin Phosphatase, dem Calcineurin (Cn), eine wichtige Rolle zu. Aktiviert über eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels führt Calcineurin u.a. zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Dieser diffundiert in den Zellkern und lagert sich an die entsprechende Stelle des TF-Promotors an. Es folgt die Induktion der TF-mRNA-Transkription.

Cyclosporin A (CsA) gehört zur Gruppe der Calcineurininhibitoren. Es bindet mit hoher Affinität an Cyclophiline (Cyp). Dieser Cyp-CsA-Komplex lagert sich wiederum an Calcineurin an und vermittelt so eine Hemmung der TF-Transkription [46]. Eine Hemmung von Calcineurin führt zu einer Abnahme der TF-Konzentration. So ist z.B. unter Cyclosporin A-Therapie eine Reduktion der TF-Expression in Monozyten zu finden [45].

Rapamycin ist kein Calcineurininhibitor. Die Fragestellung dieser Arbeit war, ob Rapamycin die Expression von Tissue factor in Monozyten induziert. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die immer wieder zu findenden Berichte über eine prokoagulatorische Nebenwirkung dieses Immunsuppressivums.

Daher wurden in dieser Studie humane Monozyten in-vitro untersucht. Sie kommen ubiquitär im Körper vor und spielen eine wichtige Rolle im Rahmen immunologischer Prozesse.

Nach Stimulation der Monozyten in-vitro mit aufsteigenden Rapamycinkonzentrationen konnte eine gleichsinnige Zunahme der TF-mRNA-Konzentration beobachtet werden. Auch die extrazelluläre TF-Expression nahm konzentrationsabhängig zu, ebenso fand sich eine proportionale Zunahme der TF-Aktivität.

Signifikante Veränderungen fanden sich bereits bei einer Konzentration von 10 ng/ml Rapamycin, was in etwa der therapeutischen Konzentration in vivo entspricht. Es ist also anzunehmen, dass die hier experimentell ermittelten Veränderungen auch bei Patienten, die Rapamycin erhalten, zu beobachten wären. Dies müsste aber noch untersucht werden, z.B. durch Messung der TF-mRNA-Menge in Monozyten von mit Rapamycin behandelten Patienten.

Eine reine Vermehrung von mRNA muss nicht zwingend zu einer messbaren Mengenänderung des kodierten Produkts führen. In dieser Arbeit jedoch führte Rapamycin in-vitro, auch bereits in therapeutischer Dosierung, zu einer Zunahme des extrazellulären TF-Proteins. Auch die Aktivität des Tissue factors nahm proportional zur Rapamycinkonzentration zu.

Da es sich bei TF um den Hauptinitiator der extrinsischen Gerinnungskaskade handelt, wäre somit eine gesteigerte Gerinnungsaktivierung unter Rapamycintherapie durchaus erklärbar.

Hinzu kommt, dass es unter den Bedingungen einer Transplantation durch verschiedene andere Stimuli zu einer Zunahme von TF kommen kann. Bukovsky et al. beschrieben nach tierexperimentellen Nierentransplantationen ein vermehrtes Vorkommen von Tissue factor in renalen Zellverbänden, wie z.B. der Kapsel oder der Adventitia von Nierengefäßen, die regelhaft mit Fibrinablagerungen u.a. in Glomerula assoziiert war [12]. Auch ist die TF-Expression in Monozyten nach Nierentransplantation über das basale Niveau gesteigert. So fanden

Rothberger et al. erhöhte TF-Konzentrationen in Leukozyten als Folge allogener Nierentransplantation, welche ihrer Ansicht nach Einfluss auf die Organabstoßung durch Koagulopathien haben könnten [79].

Zu einer Hochregulierung von TF kann auch Hypoxie führen [99]. So wäre es denkbar, dass die Ischämiezeit des Transplantats eine TF-Zunahme triggert.

Eilertsen et al. untersuchten die TF-Aktivität in zirkulierenden humanen Monozyten nach LPS-Stimulation einer Vollblutprobe [27]. Um Signalwege der TF-Regulierung zu untersuchen, setzten sie verschiedene Inhibitoren, z.B. gegen Proteinkinase C (PKC) und platelet activating factor (PAF), ein. Dabei wiesen sie in ihrer Arbeit nach, dass nur die Kombination verschiedener Inhibitoren zu einer nennenswerten Abnahme der TF-Konzentration in der Blutprobe führte. Der alleinige Einsatz nur eines Inhibitors schien ohne klinische Relevanz zu sein.

Diese Beobachtung wäre auch in umgekehrter Richtung denkbar. Eine bedeutende Zunahme der TF-Aktivierung wäre dann nur über eine gemeinsame Stimulierung über verschiedene Signalwege erreichbar.

Die Menge an TF, die unter Einfluss von Rapamycin exprimiert wird, reicht möglicherweise nicht aus, um allein für eine klinisch relevante Hyperkoagulabilität verantwortlich zu sein. Ist TF jedoch nach Transplantation bereits durch diverse andere Wege ubiquitär und insbesondere in der Niere erhöht, so kann die zusätzliche rapamycininduzierte TF-Zunahme für Fibrinablagerungen verantwortlich sein.

Demnach hätte Rapamycin über die Expression von TF eine prokoagulatorische Fähigkeit, welche unter den Bedingungen einer Transplantation zu beachten wäre. Ob diese Fähigkeit klinisch relevant wird, hängt jedoch im Einzelfall vom Zusammenspiel mit anderen Einflüssen auf die TF-Produktion ab. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Beobachtungen bezüglich thrombotischer Ereignisse (s.o.).

Unter antiinflammatorischen Einflüssen wird TF in Monozyten supprimiert. So konnten bereits Del Prete et al. nachweisen, dass die entzündungshemmenden Interleukine IL-4, IL-10 und IL-13 die TF-Produktion in Monozyten reduzieren [21]. Eine durch das proinflammatorische Interleukin IL-1 ausgelöste TF-Synthese kann ebenfalls durch diese Interleukine inhibiert werden [69]. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass der wichtige Ligand CD 14 an dieser Hemmung beteiligt ist [16].

Der Einfluss eines wesentlichen antiinflammatorischen Interleukins, das Interleukin 4, wurde in dieser Arbeit untersucht. Es wurde festgestellt, dass IL-4 in der Lage ist, die durch Rapamycin induzierte TF-Expression zu inhibieren. Unter Einfluss von Rapamycin und IL-4 liegt die gemessene TF-mRNA-Konzentration noch deutlich unter der basalen TF-Expression von gänzlich unstimulierten Monozyten. Wird eine Entzündungsreaktion durch Endotoxinzugabe simuliert, so kommt es zu einer stärkeren TF-Produktion.

Dies ließe den Schluss zu, dass die beobachtete TF-Zunahme unter Rapamycineinfluss möglicherweise nur in entzündlicher Umgebung klinisch relevant wird. Dies könnte ebenfalls die unterschiedlichen Beobachtungen diverser Autoren erklären, nach denen Rapamycin einerseits verdächtigt wird, das Thromboserisiko zu erhöhen, und andererseits nicht.

Zum anderen wird Rapamycin auch als Beschichtung von Gefäßstents in der Kardiologie verwendet. Hier macht man sich den wachstumshemmenden Effekt von Rapamycin bei der Verhinderung von Restenosen nach koronararteriellen Stentimplantationen zu Nutze. Das Ziel ist es, eine durch Endothelzellwachstum hervorgerufene in-stent Restenose zu verhindern. In einigen Studien zeigen Patienten mit sirolimus-eluting-stents (SES) eine signifikant niedrigere Restenoserate und ein besseres klinisches Outcome [58;20]. Der lokale Effekt für eine vermehrte Expression von TF ist offensichtlich in diesem Zusammenhang von untergeordneter Bedeutung.

Würde Rapamycin in jedem Fall eine thrombogene Wirkung haben, so wären diese Erfolge vermutlich nicht so eindeutig. Da es sich hierbei jedoch um eine lokale Anwendung in wenig entzündlicher Umgebung handelt, so könnte die produzierte Menge an TF nicht für klinisch relevante Auswirkungen reichen.

Wenn Rapamycin wie beobachtet zu einer vermehrten TF-Expression führt, so stellt sich die Frage, über welche Mechanismen dies reguliert wird. Damit äußere Einflüsse eine intrazelluläre Antwort hervorrufen können, ist zunächst eine Signalübertragung notwendig.

Betrachtet man den Signalweg zur Expression von Tissue factor, so kommt u.a. der Proteinkinase C eine Schlüsselrolle zu. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass, z.B. durch Bindung von LPS an den zellulären Rezeptor CD 14, die Aktivierung dieser Kinase zu einer Produktion von TF in humanen Monozyten und Makrophagen führt [18;90;13]. In anderen Zellen wie z.B. Mesangium- oder Gefäßmuskelzellen ist die PKC ebenfalls in die TF-Expression involviert [98;56]. Aktivierte PKC führt über die Phosphorylierung der I κ B α -Kinase (IKK) zu einer Hochregulierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B [92;80]. Dieser gelangt in den Zellkern und lagert sich an die entsprechende Stelle des TF-Promotors an. Es folgt die Induktion der TF-mRNA-Transkription.

Die Frage war, ob der Signalweg über die PKC auch für die TF-Expression nach Einwirkung von Rapamycin von Bedeutung ist. Zur Klärung wurde der selektive PKC-Inhibitor Calphostin eingesetzt. Seine Selektivität erlangt dieser Stoff durch die Bindung über eine Diacylglycerol-Bindungsstelle, welche einzigartig für die Proteinkinase C ist [53]. Durch diesen Inhibitor wird der intrazelluläre Reaktionsweg unterbrochen.

In den Versuchen blieb nach PKC-Inhibition mittels Calphostin die sonst unter Rapamycineinfluss beobachtete TF-Steigerung in den Monozyten aus. Die Inkubation mit 100 ng/ml Rapamycin in Anwesenheit von Calphostin vermochte die TF-Konzentration nicht über

die basale Expression zu steigern, wie dies bei alleinigem Rapamycinzusatz deutlich zu beobachten war.

Dies lässt den Schluss zu, dass die TF-Expression durch das Immunsuppressivum Rapamycin von der Proteinkinase C abhängig ist.

Fügt man während der Inkubation der Monozyten den Stoff 1,2-Dioctanoyl-sn-glycerol (DOG) der Nährlösung zu, so zeigt sich eine deutliche Steigerung der TF-Expression.

DOG ist ein Aktivator der Proteinkinase C. Im Hinblick auf obige Erläuterungen ist diese Beobachtung erklärbar. Gibt man zusätzlich zu DOG noch Rapamycin (100 ng/ml) hinzu, so steigert dies nur noch geringfügig weiter die TF-mRNA-Menge. Dies lässt ebenfalls darauf schliessen, dass die Signalkaskade via Proteinkinase C sehr wichtig für eine rapamycininduzierte TF-Expression ist.

Wenn man annimmt, dass die PKC durch DOG bereits in hohem Maße aktiviert ist, so führt die Zugabe von Rapamycin zu keiner wesentlichen Aktivitätszunahme. Würde Rapamycin jedoch über eine zweite, von PKC differente Signalkaskade aktivierend auf die TF-Expression wirken, so wäre eine stärkere Zunahme von TF zu erwarten gewesen.

In Anbetracht der unabhängigen Ergebnisse mit dem PKC-Inhibitor Calphostin und dem Aktivator DOG dürfte jedoch davon auszugehen sein, dass der Proteinkinase C eine zentrale Rolle für die rapamycininduzierte TF-Expression zukommt.

5.1 Schlussbetrachtung

Es konnte gezeigt werden, dass humane Monozyten in-vitro unter Einfluss von Rapamycin konzentrationsabhängig Tissue factor exprimieren. Es kommt zu einer Zunahme der prokoagulatorischen Fähigkeit dieser Zellen. Rapamycin kann somit einen Risikofaktor für thrombotische Komplikationen darstellen.

In Anbetracht der zum Teil gegensätzlichen Berichte über thrombotische Komplikationen unter Rapamycintherapie darf jedoch in Frage gestellt werden, ob die gerinnungsaktivierende Fähigkeit von Rapamycin allein ausreicht, um in klinisch relevantem Ausmaß zu Fibrinablagerungen zu führen. Vermutlich bedarf es dazu mehrerer prokoagulatorischer Einflüsse. Diese finden sich z.B. in entzündlicher Umgebung, wie sie häufig bei Transplantatempfängern zu beobachten ist.

Nachgewiesen wurde, dass die Proteinkinase C in die Signalkaskade der TF-Expression durch Rapamycin eingebunden ist.

Interleukin 4 führt zu einer Hemmung der TF-Expression in Monozyten. Da IL-4 ein antiinflammatorisch wirksamer Mediator ist, könnte die Reduktion entzündlicher Herde ein wirksamer Schutz vor rapamycininduzierten Thrombosen sein.

6 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|-------------------------------------|
| °C | Grad Celsius |
| Abb | Abbildung |
| AS | Aminosäure |
| bp | Basenpaar |
| Ca | Calcium |
| cDNA | copy-Desoxyribonukleinacid |
| cm | Centimeter (10^{-2} m) |
| Cn | Calcineurin |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| CRP | C-reaktives Protein |
| DNA | Desoxyribonukleinacid |
| dNTP | Desoxynuklotidtriphosphat |
| DOG | 1,2-Dioctanoyl-sn-glycerol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| FACS | Fluorescence Aktivated Cell Sorting |
| FCS | Fetal-calf-serum |
| FITC | Fluoreszeinisothiocyanat |
| FKBP | FK 506 Binding Protein |
| FRAP | FKBP-Rapamycin Associated Protein |
| g | Gramm |
| GVHD | Graft-versus-Host-Disease |
| IKK | I κ B α -Kinase |

| | |
|----------------|--|
| IL | Interleukin |
| kDA | KiloDalton |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| M | Molar |
| MAb | Mouse antibody |
| Mg | Magnesium |
| min | Minute |
| ml | Milliliter (10^{-3} l) |
| mRNA | Messenger-Ribonukleinacid |
| μ g | Mikrogramm (10^{-6} g) |
| μ l | Mikroliter (10^{-6} l) |
| μ M | Mikromolar (10^{-6} M) |
| NaN_3 | Natriumacetat |
| ng | Nanogramm (10^{-9} g) |
| nm | Nanometer (10^{-9} m) |
| PBS | Phosphor buffered saline |
| PCR | Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion) |
| PE | Phytoerythrin |
| PKC | Proteinkinase C |
| RNA | Ribonukleinacid |
| rpm | Rounds per minute |
| RT | Reverse transcriptase |
| SES | Sirolimus-eluting stent |

| | |
|------|------------------------------------|
| Taq | Thermophilus aquaticus |
| TF | Tissue factor |
| TFPI | Tissue factor pathway inhibitor |
| TNF | Tumor necrosis factor |
| TRIS | Trihydroxymethylaminomethan |
| tRNA | Transfer-Ribonukleinacid |
| U | Units |
| UV | Ultraviolett |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor |
| Vol% | Volumen-Prozent |

7 Literaturverzeichnis

- (1) Sirolimus: New preparation. No tangible advance in renal transplantation *Prescrire Int* 2002; 11(62):165-166.
- (2) Albers MW, Brown EJ, Tanaka A, Williams RT, Hall FL, Schreiber SL. An FKBP-rapamycin-sensitive, cyclin-dependent kinase activity that correlates with the FKBP-rapamycin-induced G1 arrest point in MG-63 cells. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 696:54-62.
- (3) Albers MW, Williams RT, Brown EJ, Tanaka A, Hall FL, Schreiber SL. FKBP-rapamycin inhibits a cyclin-dependent kinase activity and a cyclin D1-Cdk association in early G1 of an osteosarcoma cell line. *J Biol Chem* 1993; 268(30):22825-22829.
- (4) Amirkhosravi A, Alexander M, May K, Francis DA, Warnes G, Biggerstaff J, Francis JL. The importance of platelets in the expression of monocyte tissue factor antigen measured by a new whole blood flow cytometric assay. *Thromb Haemost* 1996; 75(1):87-95.
- (5) Andree HA, Nemerson Y. Tissue factor: regulation of activity by flow and phospholipid surfaces. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995; 6(3):189-197.
- (6) Babinska A, Markell MS, Salifu MO, Akoad M, Ehrlich YH, Kornecki E. Enhancement of human platelet aggregation and secretion induced by rapamycin. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13(12):3153-3159.
- (7) Bakir N, Sluiter WJ, Ploeg RJ, van Son WJ, Tegzess AM. Primary renal graft thrombosis. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11(1):140-147.

- (8) Banner DW, D'Arcy A, Chene C, Winkler FK, Guha A, Konigsberg WH, Nemerson Y, Kirchhofer D. The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature* 1996; 380(6569):41-46.
- (9) Barone GW, Gurley BJ, Abul-Ezz SR, Gokden N. Sirolimus-induced thrombotic microangiopathy in a renal transplant recipient. *Am J Kidney Dis* 2003; 42(1):202-206.
- (10) Bradley BA. Does the risk of acute rejection really decrease with increasing recipient age? *Transpl Int* 2000; 13 Suppl 1:S42-S44.
- (11) Bram RJ, Hung DT, Martin PK, Schreiber SL, Crabtree GR. Identification of the immunophilins capable of mediating inhibition of signal transduction by cyclosporin A and FK506: roles of calcineurin binding and cellular location. *Mol Cell Biol* 1993; 13(8):4760-4769.
- (12) Bukovsky A, Labarrere CA, Haag B, Carter C, Faulk WP. Tissue factor in normal and transplanted human kidneys. *Transplantation* 1992; 54(4):644-650.
- (13) Car BD, Slauson DO, Dore M, Suyemoto MM. Endotoxin-mediated bovine alveolar macrophage procoagulant induction is dependent on protein kinase C activation. *Inflammation* 1990; 14(6):681-689.
- (14) Carson SD, Henry WM, Shows TB. Tissue factor gene localized to human chromosome 1 (1pter----1p21). *Science* 1985; 229(4717):991-993.
- (15) Chen BJ, Morris RE, Chao NJ. Graft-versus-host disease prevention by rapamycin: cellular mechanisms. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000; 6(5A):529-536.

- (16) Chu AJ, Prasad JK. Antagonism by IL-4 and IL-10 of endotoxin-induced tissue factor activation in monocytic THP-1 cells: activating role of CD14 ligation. *J Surg Res* 1998; 80(1):80-87.
- (17) Collins PW, Noble KE, Reittie JR, Hoffbrand AV, Pasi KJ, Yong KL. Induction of tissue factor expression in human monocyte/endothelium cocultures. *Br J Haematol* 1995; 91(4):963-970.
- (18) Dean DF, Bochsler PN, Carroll RC, Olchowy TW, Neilsen NR, Slauson DO. Signaling pathways for tissue factor expression in lipopolysaccharide-stimulated bovine alveolar macrophages. *Am J Vet Res* 1998; 59(4):445-451.
- (19) Dean PG, Lund WJ, Larson TS, Prieto M, Nyberg SL, Ishitani MB, Kremers WK, Stegall MD. Wound-healing complications after kidney transplantation: a prospective, randomized comparison of sirolimus and tacrolimus. *Transplantation* 2004; 77(10):1555-1561.
- (20) Degertekin M, Serruys PW, Tanabe K, Lee CH, Sousa JE, Colombo A, Morice MC, Ligthart JM, de Feyter PJ. Long-term follow-up of incomplete stent apposition in patients who received sirolimus-eluting stent for de novo coronary lesions: an intravascular ultrasound analysis. *Circulation* 2003; 108(22):2747-2750.
- (21) Del Prete G, De Carli M, Lammel RM, D'Elios MM, Daniel KC, Giusti B, Abbate R, Romagnani S. Th1 and Th2 T-helper cells exert opposite regulatory effects on procoagulant activity and tissue factor production by human monocytes. *Blood* 1995; 86(1):250-257.

- (22) Delmas S, Picot MC, Vergnes C, Cristol JP, Mourad G. [Risk factors of chronic rejection in kidney transplantation, results of a single center study]. *Nephrologie* 1999; 20(3):153-158.
- (23) Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 1989; 134(5):1087-1097.
- (24) Dumont FJ, Su Q. Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin. *Life Sci* 1996; 58(5):373-395.
- (25) Dunkelberg JC, Trotter JF, Wachs M, Bak T, Kugelmas M, Steinberg T, Everson GT, Kam I. Sirolimus as primary immunosuppression in liver transplantation is not associated with hepatic artery or wound complications. *Liver Transpl* 2003; 9(5):463-468.
- (26) Edwards C, House A, Shahinian V, Knoll G. Sirolimus-based immunosuppression for transplant-associated thrombotic microangiopathy. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17(8):1524-1526.
- (27) Eilertsen KE, Osterud B. The central role of thromboxane and platelet activating factor receptors in ex vivo regulation of endotoxin-induced monocyte tissue factor activity in human whole blood. *J Endotoxin Res* 2002; 8(4):285-293.
- (28) Ernofsson M, Tenno T, Siegbahn A. Inhibition of tissue factor surface expression in human peripheral blood monocytes exposed to cytokines. *Br J Haematol* 1996; 95(2):249-257.
- (29) Fleck RA, Rao LV, Rapaport SI, Varki N. Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific,

- polyclonal anti-human tissue factor antibody. *Thromb Res* 1990; 59(2):421-437.
- (30) Fortin MC, Raymond MA, Madore F, Fugere JA, Paquet M, St Louis G, Hebert MJ. Increased risk of thrombotic microangiopathy in patients receiving a cyclosporin-sirolimus combination. *Am J Transplant* 2004; 4(6):946-952.
- (31) Giustacchini P, Pisanti F, Citterio F, De Gaetano AM, Castagneto M, Nanni G. Renal vein thrombosis after renal transplantation: an important cause of graft loss. *Transplant Proc* 2002; 34(6):2126-2127.
- (32) Golino P, Ragni M, Cimmino G, Forte L. Role of tissue factor pathway inhibitor in the regulation of tissue factor-dependent blood coagulation. *Cardiovasc Drug Rev* 2002; 20(1):67-80.
- (33) Grau V, Stehling O, Garn H, Steiniger B. Accumulating monocytes in the vasculature of rat renal allografts: phenotype, cytokine, inducible nitric oxide synthase, and tissue factor mRNA expression. *Transplantation* 2001; 71(1):37-46.
- (34) Gregory SA, Edgington TS. Tissue factor induction in human monocytes. Two distinct mechanisms displayed by different alloantigen-responsive T cell clones. *J Clin Invest* 1985; 76(6):2440-2445.
- (35) Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW, Geissler EK. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 2002; 8(2):128-135.
- (36) Guilbeau JM. Delayed wound healing with sirolimus after liver transplant. *Ann Pharmacother* 2002; 36(9):1391-1395.

- (37) Gupta P, Kaufman S, Fishbein TM. Sirolimus for solid organ transplantation in children. *Pediatr Transplant* 2005; 9(3):269-276.
- (38) Harlos K, Martin DM, O'Brien DP, Jones EY, Stuart DI, Polikarpov I, Miller A, Tuddenham EG, Boys CW. Crystal structure of the extracellular region of human tissue factor. *Nature* 1994; 370(6491):662-666.
- (39) Hashemolhosseini S, Nagamine Y, Morley SJ, Desrivieres S, Mercep L, Ferrari S. Rapamycin inhibition of the G1 to S transition is mediated by effects on cyclin D1 mRNA and protein stability. *J Biol Chem* 1998; 273(23):14424-14429.
- (40) Heidenreich S, August C, Nowak-Gottl U. Prothrombotic risk factors and acute kidney transplant rejection. *Kidney Blood Press Res* 1998; 21(2-4):293-295.
- (41) Heidenreich S, Dercken C, August C, Koch HG, Nowak-Gottl U. High rate of acute rejections in renal allograft recipients with thrombophilic risk factors. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9(7):1309-1313.
- (42) Heidenreich S, Junker R, Wolters H, Lang D, Hessing S, Nitsche G, Nowak-Gottl U. Outcome of kidney transplantation in patients with inherited thrombophilia: data of a prospective study. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(1):234-239.
- (43) Herbert JM, Corseaux D, Lale A, Bernat A. Hypoxia primes endotoxin-induced tissue factor expression in human monocytes and endothelial cells by a PAF-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 1996; 169(2):290-299.
- (44) Higashi S, Iwanaga S. Molecular interaction between factor VII and tissue factor. *Int J Hematol* 1998; 67(3):229-241.

- (45) Holschermann H, Durfeld F, Maus U, Bierhaus A, Heidinger K, Lohmeyer J, Nawroth PP, Tillmanns H, Haberbosch W. Cyclosporine a inhibits tissue factor expression in monocytes/macrophages. *Blood* 1996; 88(10):3837-3845.
- (46) Holschermann H, Rascher C, Oelschlager C, Stapfer G, Langenstein A, Staubitz A, Maus U, Tillmanns H, Bang H, Haberbosch W. Opposite regulation of tissue factor expression by calcineurin in monocytes and endothelial cells. *J Immunol* 2001; 166(12):7112-7120.
- (47) Huang S, Houghton PJ. Targeting mTOR signaling for cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* 2003; 3(4):371-377.
- (48) Ibanez JP, Monteverde ML, Goldberg J, Diaz MA, Turconi A. Sirolimus in pediatric renal transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37(2):682-684.
- (49) Johnson RW. Sirolimus (Rapamune) in renal transplantation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002; 11(6):603-607.
- (50) Jumani A, Hala K, Tahir S, Al Ghamdi G, Al Flaiw A, Hejaili F, Qureshi J, Raza H, Ghalib M, Khader AA. Causes of acute thrombotic microangiopathy in patients receiving kidney transplantation. *Exp Clin Transplant* 2004; 2(2):268-272.
- (51) Kahan BD. Sirolimus: a comprehensive review. *Expert Opin Pharmacother* 2001; 2(11):1903-1917.
- (52) Kahan BD. Sirolimus-based immunosuppression: present state of the art. *J Nephrol* 2004; 17 Suppl 8:S32-S39.

- (53) Kobayashi E, Nakano H, Morimoto M, Tamaoki T. Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 159(2):548-553.
- (54) Kujovich JL. Thrombophilia and thrombotic problems in renal transplant patients. *Transplantation* 2004; 77(7):959-964.
- (55) Kuypers DR. Benefit-risk assessment of sirolimus in renal transplantation. *Drug Saf* 2005; 28(2):153-181.
- (56) Lang D, Terstesse M, Dohle F, Bangen P, Banas B, Pauels HG, Heidenreich S. Protein kinase C (PKC) dependent induction of tissue factor (TF) by mesangial cells in response to inflammatory mediators and release during apoptosis. *Br J Pharmacol* 2002; 137(7):1116-1124.
- (57) Langer RM, Kahan BD. Sirolimus does not increase the risk for postoperative thromboembolic events among renal transplant recipients. *Transplantation* 2003; 76(2):318-323.
- (58) Lemos PA, Saia F, Hofma SH, Daemen J, Ong AT, Arampatzis CA, Hoye A, McFadden E, Sianos G, Smits PC, van der Giessen WJ, de Feyter P, van Domburg RT, Serruys PW. Short- and long-term clinical benefit of sirolimus-eluting stents compared to conventional bare stents for patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43(4):704-708.
- (59) Liu J, Albers MW, Wandless TJ, Luan S, Alberg DG, Belshaw PJ, Cohen P, MacKintosh C, Klee CB, Schreiber SL. Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity. *Biochemistry* 1992; 31(16):3896-3901.

- (60) Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991; 66(4):807-815.
- (61) Lo A, Egidi MF, Gaber LW, Gaber AO. Observations on the use of sirolimus and tacrolimus in high-risk renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2003; 35(3 Suppl):105S-108S.
- (62) Martin DM, Boys CW, Ruf W. Tissue factor: molecular recognition and cofactor function. *FASEB J* 1995; 9(10):852-859.
- (63) Matas AJ, Payne WD, Sutherland DE, Humar A, Gruessner RW, Kandaswamy R, Dunn DL, Gillingham KJ, Najarian JS. 2,500 living donor kidney transplants: a single-center experience. *Ann Surg* 2001; 234(2):149-164.
- (64) Mayer C, Zhao J, Yuan X, Grummt I. mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev* 2004; 18(4):423-434.
- (65) Mita MM, Mita A, Rowinsky EK. The molecular target of rapamycin (mTOR) as a therapeutic target against cancer. *Cancer Biol Ther* 2003; 2(4 Suppl 1):S169-S177.
- (66) Monti P, Mercurio A, Leone BE, Valerio DC, Allavena P, Piemonti L. Rapamycin impairs antigen uptake of human dendritic cells. *Transplantation* 2003; 75(1):137-145.
- (67) Oberbauer R, Kreis H, Johnson RW, Mota A, Claesson K, Ruiz JC, Wilczek H, Jamieson N, Henriques AC, Paczek L, Chapman J, Burke JT. Long-term improvement in renal function with sirolimus after early cyclosporine withdrawal in renal transplant recipients: 2-year results of the Rapamune Maintenance Regimen Study. *Transplantation* 2003; 76(2):364-370.

- (68) Opelz G. [Prognostic factors in the course of kidney transplantation]. *Urologe A* 1994; 33(5):377-382.
- (69) Osnes LT, Westvik AB, Joo GB, Okkenhaug C, Kierulf P. Inhibition of IL-1 induced tissue factor (TF) synthesis and procoagulant activity (PCA) in purified human monocytes by IL-4, IL-10 and IL-13. *Cytokine* 1996; 8(11):822-827.
- (70) Paffen E, Vos HL, Bertina RM. C-reactive protein does not directly induce tissue factor in human monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(5):975-981.
- (71) Podbielski J, Schoenberg L. Use of sirolimus in kidney transplantation. *Prog Transplant* 2001; 11(1):29-32.
- (72) Pradier O, Willems F, Abramowicz D, Schandene L, de Boer M, Thielemans K, Capel P, Goldman M. CD40 engagement induces monocyte procoagulant activity through an interleukin-10 resistant pathway. *Eur J Immunol* 1996; 26(12):3048-3054.
- (73) Ramani M, Ollivier V, Ternisien C, Vu T, Elbim C, Hakim J, de Prost D. Interleukin 4 prevents the induction of tissue factor mRNA in human monocytes in response to LPS or PMA stimulation. *Br J Haematol* 1993; 85(3):462-468.
- (74) Rapaport SI, Rao LV. Initiation and regulation of tissue factor-dependent blood coagulation. *Arterioscler Thromb* 1992; 12(10):1111-1121.
- (75) Reynolds JC, Agodoa LY, Yuan CM, Abbott KC. Thrombotic microangiopathy after renal transplantation in the United States. *Am J Kidney Dis* 2003; 42(5):1058-1068.

- (76) Robson M, Cote I, Abbs I, Koffman G, Goldsmith D. Thrombotic micro-angiopathy with sirolimus-based immunosuppression: potentiation of calcineurin-inhibitor-induced endothelial damage? *Am J Transplant* 2003; 3(3):324-327.
- (77) Rossmann P, Jirka J, Chadimova M, Reneltova I, Saudek F. Arteriolosclerosis of the human renal allograft: morphology, origin, life history and relationship to cyclosporine therapy. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1991; 418(2):129-141.
- (78) Rothberger H, Barringer M, Meredith J. Increased tissue factor activity of monocytes/macrophages isolated from canine renal allografts. *Blood* 1984; 63(3):623-628.
- (79) Rothberger H, Meredith J, Mutton T, Brown J, McGee MP. Increased tissue factor activity generation in vitro by canine blood leukocytes associated with allogeneic kidney transplantation and rejection. *Thromb Haemost* 1985; 53(1):1-4.
- (80) Saijo K, Mecklenbrauker I, Santana A, Leitger M, Schmedt C, Tarakhovsky A. Protein kinase C beta controls nuclear factor kappaB activation in B cells through selective regulation of the IkappaB kinase alpha. *J Exp Med* 2002; 195(12):1647-1652.
- (81) Saikali JA, Truong LD, Suki WN. Sirolimus may promote thrombotic microangiopathy. *Am J Transplant* 2003; 3(2):229-230.
- (82) Scarpati EM, Wen D, Broze GJ, Jr., Miletich JP, Flandermeyer RR, Siegel NR, Sadler JE. Human tissue factor: cDNA sequence and chromosome localization of the gene. *Biochemistry* 1987; 26(17):5234-5238.

- (83) Scholz T, Zhao L, Temmler U, Bath P, Heptinstall S, Losche W. The GPIIb/IIIa antagonist eptifibatide markedly potentiates platelet-leukocyte interaction and tissue factor expression following platelet activation in whole blood in vitro. *Platelets* 2002; 13(7):401-406.
- (84) Singh A, Stablein D, Tejani A. Risk factors for vascular thrombosis in pediatric renal transplantation: a special report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study. *Transplantation* 1997; 63(9):1263-1267.
- (85) Sousa JE, Costa MA, Abizaid A, Sousa AG, Feres F, Mattos LA, Centemero M, Maldonado G, Abizaid AS, Pinto I, Falotico R, Jaeger J, Popma JJ, Serruys PW. Sirolimus-eluting stent for the treatment of in-stent restenosis: a quantitative coronary angiography and three-dimensional intravascular ultrasound study. *Circulation* 2003; 107(1):24-27.
- (86) Spiros D, Christos D, John B, Burke GW, Miller J, Ciancio G. Vascular complications of pancreas transplantation. *Pancreas* 2004; 28(4):413-420.
- (87) Tenno T, Botling J, Oberg F, Nilsson K, Siegbahn A. Tissue factor expression in human monocytic cell lines. *Thromb Res* 1997; 88(2):215-228.
- (88) Terada N, Patel HR, Takase K, Kohno K, Nairn AC, Gelfand EW. Rapamycin selectively inhibits translation of mRNAs encoding elongation factors and ribosomal proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(24):11477-11481.

- (89) Terada N, Takase K, Papst P, Nairn AC, Gelfand EW. Rapamycin inhibits ribosomal protein synthesis and induces G1 prolongation in mitogen-activated T lymphocytes. *J Immunol* 1995; 155(7):3418-3426.
- (90) Ternisien C, Ramani M, Ollivier V, Khechai F, Vu T, Hakim J, de Prost D. Endotoxin-induced tissue factor in human monocytes is dependent upon protein kinase C activation. *Thromb Haemost* 1993; 70(5):800-806.
- (91) Trotter JF. Sirolimus in liver transplantation. *Transplant Proc* 2003; 35(3 Suppl):193S-200S.
- (92) Trushin SA, Pennington KN, Algeciras-Schimmich A, Paya CV. Protein kinase C and calcineurin synergize to activate I κ B kinase and NF- κ B in T lymphocytes. *J Biol Chem* 1999; 274(33):22923-22931.
- (93) Tsai MK, Lee CY, Hu RH, Lee PH. Sirolimus add-on rescue therapy can benefit patients with chronic renal allograft dysfunction. *J Formos Med Assoc* 2003; 102(12):863-867.
- (94) van der Logt CP, Dirven RJ, Reitsma PH, Bertina RM. Expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in monocytes in response to bacterial lipopolysaccharide and phorbol ester. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; 5(2):211-220.
- (95) Van Duyne GD, Standaert RF, Karplus PA, Schreiber SL, Clardy J. Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. *J Mol Biol* 1993; 229(1):105-124.

- (96) Vasquez EM. Sirolimus: a new agent for prevention of renal allograft rejection. *Am J Health Syst Pharm* 2000; 57(5):437-448.
- (97) Woltman AM, de Fijter JW, Kamerling SW, Der Kooij SW, Paul LC, Daha MR, van Kooten C. Rapamycin induces apoptosis in monocyte- and CD34-derived dendritic cells but not in monocytes and macrophages. *Blood* 2001; 98(1):174-180.
- (98) Xuereb JM, Sie P, Boneu B, Constans J. Inhibition of tissue factor synthesis by disruption of ERK kinases and PKC signaling pathways in human vascular SMCs. *Thromb Haemost* 2000; 84(1):129-136.
- (99) Yan SF, Pinsky DJ, Stern DM. A pathway leading to hypoxia-induced vascular fibrin deposition. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26(5):479-483.
- (100) Yoo SJ, Kahan BD. Combination treatment with sirolimus and ciclosporin in clinical renal transplantation: A comprehensive review. *Drugs Today (Barc)* 2001; 37(6):385-400.
- (101) Zarifian A, Meleg-Smith S, O'donovan R, Tesi RJ, Batuman V. Cyclosporine-associated thrombotic microangiopathy in renal allografts. *Kidney Int* 1999; 55(6):2457-2466.

8 Lebenslauf

Name: Jan Sackarnd

Geburtsdatum: 31. März 1977

Geburtsort: Münster (Westf.)

Familienstand: Ledig

Konfession: Evangelisch

Schule: 1983 – 1987 Martin-Luther-Grundschule Münster
1987 – 1996 Pascalgymnasium Münster
1996 Abitur

Zivildienst: 1996 – 1997 Evangelisches Krankenhaus Münster

Studium: 1997 – 1999 Vorklinischer Studienabschnitt (Münster)
1999 – 2000 1. klinischer Studienabschnitt (Münster)
2000 – 2002 2. klinischer Studienabschnitt (Münster)
2002 – 2003 3. klinischer Studienabschnitt
(Detmold, Zürich)

Abschluss: 2003 3. Staatsexamen

Beruf: seit 2003 Tätigkeit zunächst als AiP, mittlerweile als
Assistenzarzt
(jeweils Klinikum Oldenburg gGmbH,
Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin)

9 Danksagung

Zunächst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Stefan Heidenreich für die Überlassung des Dissertationsthemas und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Detlef Lang für die gute und engagierte Betreuung. Durch wissenschaftlichen Rat und stetige Gesprächsbereitschaft bekam ich von ihnen jederzeit motivierende Unterstützung.

Die Anfertigung einer solchen Arbeit kostet Zeit und Mühe. Hier wurde mir durch Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Labors Hilfe zuteil, so dass auch ihnen mein Dank gebührt.

Von meinen Eltern und meiner Freundin wurde ich immer wieder angetrieben, die Dissertation zügig abzuschließen. Auch wenn dies meinem eigenen Interesse und Ziel entsprach, so waren die ewigen Kommentare zu diesem Thema doch wirkungsvoll.

Auch meine Schwester und die Mutter meiner Freundin sollen nicht unerwähnt bleiben – die beiden wissen weshalb.

Danke.