

Aus der medizinischen Poliklinik der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

– Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. K.H. Rahn –

# **TISSUE FACTOR (TF) IN MESANGIUMZELLEN**

*Proteinkinase-C-abhängige Regulation durch Interleukin-1 $\beta$*

*und Apoptose-bedingte TF-Freisetzung*

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät der

Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

**Martin Terstesse**

aus Paderborn

2002

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

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

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Stefan Heidenreich

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Ulrike Nowak-Göttl

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.2003

**Aus der medizinischen Poliklinik der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**

– Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. K.H. Rahn –

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. S. Heidenreich

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. U. Nowak-Göttl

**Zusammenfassung**

Terstesse, Martin

**Tissue Factor (TF) in Mesangiumzellen – Proteinkinase-C-abhängige Regulation  
durch Interleukin-1 $\beta$  und Apoptose-bedingte TF-Freisetzung**

Bei entzündlichen Nierenerkrankungen werden oft glomeruläre Fibrinablagerungen und kapilläre Mikrothromben als histopathologische Zeichen einer erhöhten prokoagulatorischen Aktivität (PCA) beschrieben. Gewebsthromboplastin – engl. tissue factor (TF) – ist als der entscheidende Induktor der Thrombogenese bekannt. In dieser Arbeit wurde an Mesangiumzellen (MZ) die Expression von TF unter dem Einfluss proinflammatorischer Stimuli wie z. B. Interleukin-1 (IL-1 $\beta$ ) studiert. Die Untersuchung der TF-Regulation und ihrer intrazellulären Signalwege erfolgte mittels semi-quantitativer RT-PCR und ELISA, zusätzlich wurde die TF-bedingte PCA durch einen Faktor-VII-abhängigen Farbumschlagstest bestimmt.

In kultivierten MZ induzierte – ähnlich wie TNF- $\alpha$  und LPS – IL-1 $\beta$  Gewebsthromboplastin auf mRNA- und Proteinebene zeit- und dosisabhängig mit einem maximalen Aktivitätsanstieg nach 12 h bei 25 U/ml IL-1 $\beta$ . Die TF-Stimulation war vollständig durch den Proteinkinase-C-Inhibitor Calphostin C und durch BAPTA/AM, einen intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Chelator, blockierbar. Die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) durch Forskolin und 8-bromo-cAMP vermochte die Zytokin-induzierte TF-Expression zu supprimieren. Ein spezifischer Hemmstoff der PKA KT-5720 und 1,2-dioctanoyl-sn-glycerol als Proteinkinase-C-Aktivator steigerten die TF-mRNA-Expression und die intrazelluläre TF-Protein-Konzentration. Inflammatorische Mediatoren erhöhen somit die TF-Expression in MZ durch einen Proteinkinase-C-abhängigen intrazellulären Signalweg, während über Proteinkinase A ein negativer Rückkopplungsmechanismus besteht.

MZ, in denen durch Wasserstoffperoxid Apoptose induziert wurde, setzten hohe TF-Aktivität in ihre Zellkultur-Überstände frei, vor allem, wenn sie zuvor mit IL-1 $\beta$  stimuliert wurden. IL-1 $\beta$  konnte aber nicht signifikant die TF-Aktivität im Überstand vitaler Zellen steigern. Somit stellen in einer Entzündungsreaktion stimulierte, apoptotische MZ durch die induzierte Synthese und Freisetzung von TF möglicherweise einen wichtigen Faktor zur Initiierung der erhöhten PCA im Glomerulum dar.

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.2003

Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht in:

Lang D, Terstesse M, Dohle F, Bangen P, Banas B, Pauels HG, Heidenreich S (2002)  
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 137: 1116-1124

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VI</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<i>1.1. Die Aktivierung der plasmatischen Gerinnung in vivo .....</i>	<i>1</i>
1.1.1. TF als Kofaktor für Faktor VII.....	1
1.1.2. Modell des extrinsischen und intrinsischen Aktivierungsweges mit gemeinsamer Endstrecke .....	2
1.1.3. Revidierung des herkömmlichen Modells vom „extrinsischen“ und „intrinsischen“ Weg der Gerinnungsaktivierung.....	2
<i>1.2. Bedeutung und Eigenschaften von TF.....</i>	<i>4</i>
1.2.1. TF als zentraler Aktivator des Gerinnungssystems .....	4
1.2.2. Molekulare Struktur und Funktion von TF.....	4
1.2.3. TF als Zellmembranrezeptor mit Einfluss auf intrazelluläre Prozesse.....	5
1.2.4. Bedeutung des TF in der Embryonalentwicklung.....	6
<i>1.3. Expression von TF.....</i>	<i>7</i>
1.3.1. Nachweismethoden.....	7
1.3.2. Schutzfunktion gegen Blutverluste.....	7
1.3.3. TF-Expression unter pathologischen Bedingungen.....	8
1.3.4. TF bei Sepsis und disseminierter intravasaler Gerinnung.....	8
<i>1.4. Prokoagulatorische Aktivität und Tissue Factor in der Niere .....</i>	<i>9</i>
1.4.1. Glomeruläre Fibrinablagerungen bei entzündlichen Nierenerkrankungen .....	9
1.4.2. TF nach Nierentransplantation .....	10
1.4.3. Einfluss von ins Glomerulum eingewanderten Leukozyten.....	10
<i>1.5. Prokoagulatorische Kapazität der Mesangiumzellen .....</i>	<i>10</i>
<i>1.6. Fragestellung.....</i>	<i>11</i>

---

<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>12</b>
2.1. <i>Laborgeräte</i> .....	12
2.2. <i>Materialien</i> .....	13
2.2.1. <i>Chemikalien</i> .....	13
2.2.1.1. Stimulanzen .....	13
2.2.1.2. Reagenzien für RT-PCR.....	14
2.2.1.3. Reagenzien für Proteinanalysen .....	14
2.2.1.4. Reagenzien für durchflusszytometrischen Apoptosenachweis.....	14
2.2.1.5. Allgemein benutzte Reagenzien .....	15
2.2.2. <i>Serum für die Zellkultur</i> .....	15
2.2.3. <i>Kulturmedium und Puffer</i> .....	15
2.2.3.1. Kulturmedium für Mesangiumzellen.....	15
2.2.3.2. Einfriermedium.....	15
2.2.3.3. Trypsin/EDTA-Lösung.....	16
2.2.3.4. Kollagenase-Lösung (2mg/ml) .....	16
2.2.3.5. RLT-Lysisbuffer .....	16
2.2.3.6. RPE-Puffer .....	16
2.2.3.7. TrisHCl (10 mM).....	16
2.2.3.8. TAE-Puffer (50fach) .....	16
2.2.3.9. Laufpuffer für Gelelektrophorese .....	17
2.2.3.10. TBS .....	17
2.2.3.11. 1%iges Triton-X-100 .....	17
2.2.3.12. Waschpuffer für ELISA.....	17
2.2.3.13. Sample Buffer für ELISA.....	17
2.2.3.14. Enzym Conjugate / Enzym Conjugate Diluent .....	18
2.2.3.15. Natriumacid .....	18
2.2.3.16. 4%iger Paraformaldehyd-Puffer.....	18
2.2.3.17. Saponin-Puffer.....	18
2.2.4. <i>Primer für RT-PCR</i> .....	19
2.2.5. <i>Plastikmaterialien</i> .....	19
2.3. <i>Zellkulturmethoden</i> .....	20
2.3.1. Gewinnung und primäre Kultivierung humaner Mesangiumzellen .....	20

---

2.3.2. Immortalisierte humane Mesangiumzellen .....	20
2.3.3. Kultivierung und Passage .....	21
2.3.4. Wachstumsarretierung vor Experimenten .....	22
2.3.5. Konservierung der Zellen in flüssigem Stickstoff.....	22
2.3.5.1. Einfrieren.....	22
2.3.5.2. Auftauen .....	22
2.4. <i>In-vitro-Testsysteme</i> .....	23
2.4.1. <i>RNA-Isolation aus Zelllysaten</i> .....	23
2.4.1.1. Prinzip der RNA-Isolation.....	23
2.4.1.2. Durchführung der RNA-Isolation.....	24
2.4.2. <i>RNA-Konzentrationsmessung</i> .....	25
2.4.3. <i>RT-PCR: Reverse Transkription und Polymerase-Ketten-Reaktion</i> .....	25
2.4.3.1 Prinzip der RT-PCR .....	25
2.4.3.2. Durchführung der RT-PCR: RT-Schritt .....	28
2.4.3.3. Verdaukontrolle .....	28
2.4.3.4. PCR.....	29
2.4.3.5. Gelelektrophorese.....	30
2.4.4. <i>Proteinanalysemethoden</i> .....	30
2.4.4.1. Lyse der Zellen .....	30
2.4.4.2. Proteinbestimmung mit Bio-Rad-Reagenz.....	31
2.4.4.3. Prinzip der Bestimmung des TF-Proteins aus Zelllysaten .....	32
2.4.4.4. Durchführung des ELISA .....	33
2.4.5. <i>Aktivitätsmessung in Überständen und in Zelllysaten</i> .....	35
2.4.5.1. Testprinzip .....	35
2.4.5.2. Testdurchführung .....	35
2.4.6. <i>Apoptosenachweis mittels Durchflusszytometrie</i> .....	37
2.4.6.1. Prinzip des Apoptosenachweises mit Propidiumjodid .....	37
2.4.6.2. Prinzip der durchflusszytometrischen Messung.....	37
2.4.6.3. Durchführung des Experiments .....	38
2.5. <i>Statistische Methoden</i> .....	39

---

<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>40</b>
3.1. <i>Expression von Tissue-factor-mRNA in humanen Mesangiumzellen.....</i>	40
3.1.1. Spezifisches Signal für TF-mRNA mittels RT-PCR.....	40
3.1.2. Humane Mesangiumzellen in Proliferation.....	41
3.1.3. Nachweis der gleichmäßig vorhandenen RNA-Menge mittels Konzentrationsmessung und Vergleich der $\beta$ -Aktin-Banden.....	41
3.1.4. Wachstumsarretierung.....	42
3.1.5. Nachweis der vollständigen Verdauung der genomischen DNA.....	43
3.1.6. Unabhängigkeit des $\beta$ -Aktin-Signals von der Stimulation der Zellen mit IL-1 $\beta$ .....	45
3.2. <i>Stimulation von hMZ und tMZ.....</i>	45
3.2.1. Einfluss von Zytokinen auf die TF-mRNA-Expression bei hMZ.....	45
3.2.2. Einfluss von Zytokinen auf die TF-mRNA-Expression bei tMZ.....	46
3.2.3. Direkter Vergleich zwischen transfizierten und nicht-transfizierten Mesangiumzellen.....	48
3.3. <i>Zeit- und Dosisabhängigkeit der TF-Induktion durch IL-1<math>\beta</math>.....</i>	50
3.3.1. Zeitabhängige Induktion der TF-mRNA-Expression durch IL-1 $\beta$ .....	50
3.3.2. Dosisabhängige Induktion der TF-Expression und TF-Aktivität durch IL-1 $\beta$ .....	51
3.4. <i>PKC-abhängige TF-Stimulation.....</i>	53
3.4.1. Blockierung der PKC durch Calphostin C.....	53
3.4.2. Direkte Aktivierung der PKC durch DOG.....	54
3.5. <i>Ca<sup>2+</sup>-abhängige TF-Stimulation.....</i>	55
3.5.1. Reduktion der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Konzentration durch BAPTA/AM.....	55
3.5.2. Erhöhung der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Konzentration durch Thapsigargin.....	56
3.6. <i>Negativ regulierender Einfluss der Proteinkinase A auf die TF-Expression.....</i>	58
3.6.1. Verminderung des TF durch cAMP-abhängige Aktivierung der Proteinkinase A.....	58
3.6.2. Steigerung von TF durch selektive Inhibition der Proteinkinase A.....	59
3.7. <i>Apoptoseinduktion in Mesangiumzellen und ihre Auswirkungen auf die TF-Aktivität in Kulturmediumüberständen.....</i>	60

---

3.7.1. Induktion des programmierten Zelltods durch Wasserstoffperoxid .....	60
3.7.2. Exponentieller Anstieg der TF-Aktivität durch IL-1 $\beta$ -stimulierte, apoptotische Mesangiumzellen.....	62
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>64</b>
4.1. <i>Konsequenzen und Ursachen der TF-Hochregulation</i> .....	64
4.1.1. Hyperkoagulation bei diversen Nierenerkrankungen .....	64
4.1.2. Fibrinablagerungen und PCA im Glomerulum .....	64
4.1.3. Eingewanderte Monozyten/Makrophagen in den Glomerula der Niere.	65
4.1.4. Bedeutung und Eigenschaften von TF .....	65
4.2. <i>TF in Mesangiumzellen</i> .....	66
4.2.1. Zytokin-induzierte TF-Expression .....	66
4.2.2. Expression in Abhängigkeit vom Zellzyklus .....	67
4.3. <i>Intrazelluläre Signalwege und molekulare Mechanismen</i> .....	68
4.3.1. Proteinkinase C.....	68
4.3.2. Intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> -Konzentration .....	69
4.3.3. Proteinkinase A .....	69
4.4. <i>Mesangiumzellen und Apoptose</i> .....	70
4.4.1. TF-Aktivität in Abhängigkeit von Phosphatidylserin .....	70
4.4.2. Erhöhte TF-Aktivität an der Zelloberfläche und in den Kulturüberständen apoptotischer Zellen.....	70
4.4.3. Proliferativer Stimulus anstatt proinflammatorischer Reize .....	71
4.4.4. Mesangiumzellwachstum und Apoptose bei glomerulären Erkrankungen .....	71
4.5. <i>Zusammenfassende Schlussbetrachtung</i> .....	72
<b>5. LITERATUR .....</b>	<b>73</b>
<b>6. CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>88</b>
<b>7. DANKSAGUNG .....</b>	<b>89</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Aqua bidest.	doppelt destilliertes Wasser
BAPTA/AM	1,2-bis(2-aminophenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetra-acetat-Säure/ Acetomethylester
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosin-Mono-Phosphat
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOG	1,2-dioctanoyl-sn-glycerol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-gebundener immunologischer Test (engl. enzyme-linked immuno sorbent assay)
F	Faktor
FCS	fötales Kälber-Serum (engl. fetal calf serum)
g	Gramm
GNSO	S-nitrosoglutathion (NO-Donator)
GTC	Guanidinthiocyanat
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCL	Salzsäure
hMZ	humane, nicht-transfizierte Mesangiumzellen
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl. horse radish peroxidase)
IL-1β	Interleukin-1 beta

---

k	kilo ( $10^3$ )
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid, Endotoxin
m	milli ( $10^{-3}$ )
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
min	Minute
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MZ	Mesangiumzellen
n	nano ( $10^{-9}$ )
n>	Anzahl der Versuche größer
p	1. piko ( $10^{-12}$ ) in Kombination mit Maßeinheit 2. Angabe einer Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS mit Ca/Mg	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Kalzium- und Magnesiumzusatz (engl. Phosphat buffered Saline)
PBS ohne Ca/Mg	Phosphat-gepufferte Salzlösung ohne Kalzium- und Magnesiumzusatz (engl. Phosphat buffered Saline)
PCA	prokoagulatorische Aktivität (engl. procoagulant activity)
PCR	Polymerasen-Ketten-Reaktion (engl. polymerase chain reaction)
PDGF	engl. Abkürzung für platelet-derived growth factor
PI	Propidiumjodid
PKC	Proteinkinase C
pM	pico Molar
rel. Einh.	relative Einheiten
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase bzw. Reverse Transkription
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer (engl. tris-acetat-EDTA-buffer)
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (engl. tris-buffered saline)
TF	Tissue Factor, Gewebsthromboplastin
TFPI	engl. Abkürzung für tissue factor pathway inhibitor
TG	Thapsigargin

---

tMZ	transfizierte (immortalisierte) Mesangiumzellen / Zelllinie
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (deutsch: Einheiten)
UV	ultraviolettes Licht
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

# **1. Einleitung**

## **1.1. Die Aktivierung der plasmatischen Gerinnung in vivo**

Die Blutgerinnung mit der letztendlichen Ausbildung von Fibrin gehört zu den physiologischen Reaktions- und Abwehrmechanismen des Körpers. Von diversen menschlichen Geweben wie Gehirn, Lunge, Niere, Leber und Milz ist bekannt, dass sie durch einen im Gewebe vorhandenen Faktor das Potential besitzen, die Gerinnung des Blutes auszulösen (42). Der Faktor, der die dabei ablaufende Gerinnungskaskade startet, wird allgemein als Gewebsthromboplastin oder englisch „tissue factor“ bezeichnet (98, 118). Aus der englischen Bezeichnung ergibt sich die am meisten gebräuchliche Abkürzung „TF“, die ich auch in dieser Arbeit benutzen werde.

Ausgehend von einer prokoagulatorischen Aktivität der Zelloberfläche, abgekürzt PCA (von engl. *procoagulant activity*), ist Gewebsthromboplastin schon seit Anfang des letzten Jahrhunderts bekannt (78, 92). Weitere Synonyme für TF sind „Gewebefaktor“, „Faktor III“ bei der Durchnummerierung aller Faktoren, die an der Blutgerinnung beteiligt sind, sowie „CD 142“ in der Betrachtung als membrangebundener Rezeptor.

### **1.1.1. TF als Kofaktor für Faktor VII**

Vornehmlich konzentrierten sich alle Untersuchungen auf die essentielle Bedeutung des TF als Kofaktor im Schlüsselschritt der Initiierung der Blutgerinnung: Wenn z. B. nach einer Gewebsschädigung oder bei einer sonstigen inadäquaten Expression von TF die plasmatischen Gerinnungsfaktoren in Kontakt mit TF-exprimierenden Zellen kommen, bindet der Faktor VII bzw. die aktivierte Komponente F VIIa an den zelloberflächen- gebundenen TF (114, 118).

Diese Interaktion ist gekennzeichnet durch eine hohe Affinität des Substrates (FVII/FVIIa) mit seinem Rezeptor TF, wodurch sich die Enzymgeschwindigkeit und katalytische Fähigkeit dieses Komplexes zur Aktivierung weiterer Gerinnungsfaktoren extrem steigert. Faktor VII ist also erst nach Bindung an TF in biologisch relevanter

Weise prokoagulatorisch aktiv. Erst in Anwesenheit von Phospholipiden und Kalzium ist nachfolgend die Aktivierung der Faktoren IX und X möglich. Im Hinblick auf seine führende Rolle bei der Initiierung der Blutgerinnung wurde früher der TF-FVIIa-Komplex auch als „extrinsischer“ Aktivierungskomplex des Gerinnungssystems bezeichnet (98, 112).

### **1.1.2. Modell des extrinsischen und intrinsischen Aktivierungsweges mit gemeinsamer Endstrecke**

Ausgehend von den theoretischen Ansätzen Morawitz' aus dem Jahre 1905 (91) und von Davie/MacFarlane (83) wurde das Gerinnungssystem früher schematisch in einen extrinsischen und zusätzlich in einen intrinsischen Reaktionsweg mit einer gemeinsamen Endstrecke eingeteilt. Ersterer hat das Adjektiv „extrinsisch“ erhalten, weil TF als Initiator dieses Gerinnungsweges normalerweise nicht in Kontakt mit dem Blutstrom steht, sondern „außerhalb“ davon bleibt.

Die Funktion des intrinsischen Aktivierungsweges wurde durch die partielle Thromboplastinzeit (aPTT) erfasst. In vitro folgt alternativ zum extrinsischen Weg auf die Berührung der im Blut vorhandenen plasmatischen Kontaktfaktoren (Faktor XII, Kininogen und Präkallikrein) mit negativ geladenen Oberflächen kaskadenartig die Aktivierung von Faktor XI, Faktor IX und Faktor X (14, 74).

In der gemeinsamen Endstrecke beider Wege wird dann durch den „Prothrombinase“-Komplex, der aus Faktor Xa, Faktor Va, Phospholipiden und Kalzium besteht, Prothrombin zu Thrombin gespalten, so dass Thrombin anschließend Fibrinogen spalten kann und die freigesetzten Fibrinmonomere unter Einfluss von Faktor XIIIa zu unlöslichen Fibringerinnseln polymerisieren, was dann zur Entstehung von Thromben und Fibrinablagerungen führt.

### **1.1.3. Revidierung des herkömmlichen Modells vom „extrinsischen“ und „intrinsischen“ Weg der Gerinnungsaktivierung**

Neuere Ergebnisse legen eine Revidierung dieses Modells nahe, denn nach heutiger Auffassung ist in vivo der initiierende Schritt für die Aktivierung der Gerinnung immer die Ausbildung des Komplexes von TF mit Faktor VIIa (43, 113).

Dieser so genannte „extrinsische“ Gerinnungsweg wird aber recht schnell von TFPI (Kunitz-Inhibitor) blockiert. TFPI bindet und inaktiviert Faktor Xa; dieser Komplex stellt den eigentlichen Inhibitor für den TF-FVIIa-Komplex dar, dessen proteolytische Funktion dann gestoppt wird, wenn sich ein quartärer TF-FVIIa-FXa-TFPI-Komplex bildet (15, 31, 113).

Wenn die Blutgerinnung zwar in vivo immer über den „extrinsischen“ Gerinnungsweg startet, dieser aber dann durch TFPI sehr zügig inhibiert und damit praktisch zum Erliegen gebracht werden kann, kommt dem „intrinsischen“ Weg statt der alternativen Initiierung eine ganz andere Aufgabe zu (15, 31).

Zur Aufrechterhaltung des Gerinnungsprozesses muss nämlich Faktor Xa auf einem anderen Weg weiterhin aktiviert werden. Hier erlangen die Gerinnungsfaktoren des „intrinsischen“ Weges ihre Bedeutung (31): Bereits gebildetes Thrombin aktiviert Faktor XI (44, 45, 94), so dass unabhängig von der Aktivität des Komplexes aus TF und Faktor VIIa und unabhängig vom Kontaktsystem Faktor IXa produziert werden kann und damit die Bildung von Faktor Xa weitergeführt wird (15, 113).

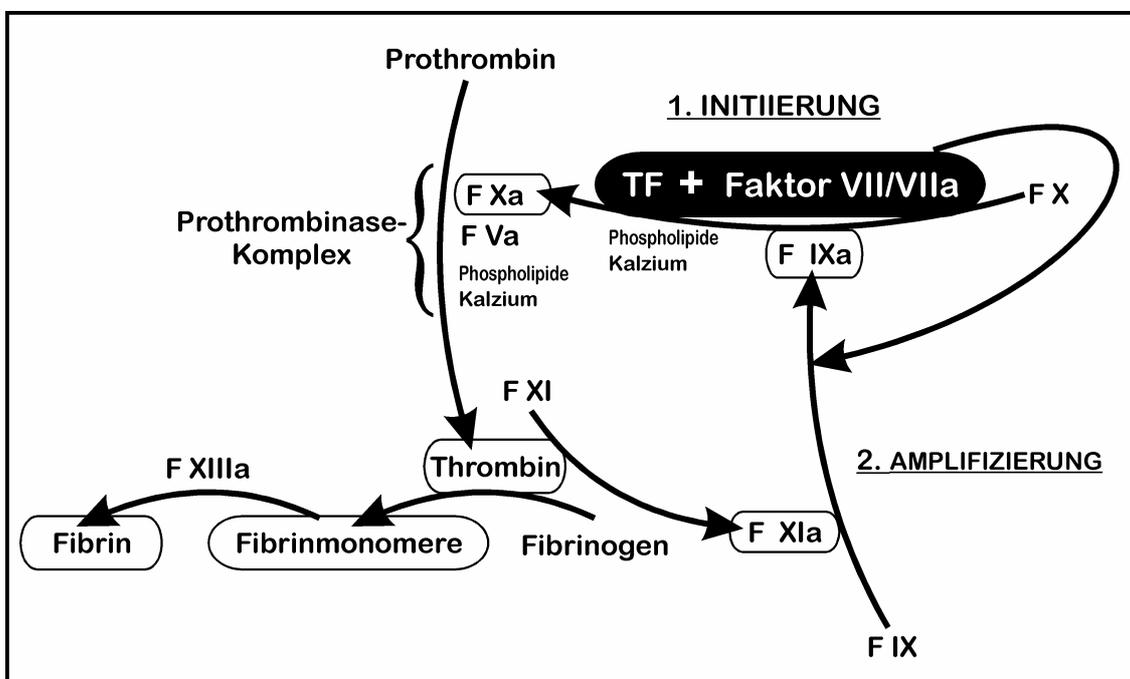


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des revidierten Modells der Blutgerinnung (in vereinfachter Form): 1. Initiierung der Gerinnungskaskade durch den TF/Faktor-VII/VIIa-Komplex. Nach dessen Inaktivierung durch TFPI 2. Amplifizierung über F-XI-Aktivierung mittels Thrombin, sowie nachfolgende Aktivierung von Faktor IX, der alternativ zum TF/Faktor-VII/VIIa-Komplex in der Lage ist, Faktor X zu aktivieren.

Nach diesem neuen revidierten Modell wird die Gerinnung also nicht durch Kontaktfaktoren „intrinsisch“ gestartet, sondern immer „extrinsisch“ durch TF. Wegen der einsetzenden Wirkung von TFPI ist dann die Aufrechterhaltung des Gerinnungsprozesses von den Faktoren IXa und VIIIa abhängig. Die Funktion des „intrinsischen“ Gerinnungswegs, der über die Faktoren XI und IX läuft, wird heute als positive Amplifizierung angesehen (15, 31, 113).

## **1.2. Bedeutung und Eigenschaften von TF**

### **1.2.1. TF als zentraler Aktivator des Gerinnungssystems**

TF kann mit dem fließenden Blut auch ohne vorherige Gewebsschädigung in Kontakt kommen, u. a. im Rahmen der Pathogenese von thrombotischen Ereignissen (103, 124). Maßgeblich an dieser Sichtweise war zuerst die Beobachtung, dass auch Zellen, die schon selbst im Gefäßsystem zu finden sind oder in direktem Kontakt dazu stehen, wie sich im Blut befindende Monozyten und Endothelzellen, unter bestimmten Umständen dazu veranlasst werden, TF zu bilden (82, 115).

In der Hämostase bzw. Thrombogenese kommt deshalb dem TF-FVIIa-Komplex die Funktion des zentralen bzw. wichtigsten Aktivators des Gerinnungssystems in vivo zu. Allein der Kontakt zwischen TF und dem Blut, das alle weiteren Faktoren der Gerinnung beinhaltet, ist ausreichend, um die Polymerisation von Fibrin zu starten und aufrecht zu erhalten, wobei Faktor VII nur im Komplex mit TF seine volle proteolytische Aktivität entfalten und zu einer biologisch effektiven Aktivierung von Faktor IX und Faktor X beitragen kann. Insofern wurde bei Berücksichtigung der vorgenannten Umstände der Fokus meiner experimentellen Untersuchungen an Mesangiumzellen auf TF als Messgröße gelegt.

### **1.2.2. Molekulare Struktur und Funktion von TF**

Die genetische Information für TF wird von einem einzigen Gen auf Chromosom 1 (p21-p22) kodiert (25). TF-Apoprotein ist ein integrales Phospholipidmembran-gebundenes Oberflächen-Glykoprotein, das 47 Kilodalton groß ist. Es ist in drei Domä-

nen aufgeteilt (16, 54, 126): Eine extrazelluläre Domäne (Aminosäuren 1-219), dem löslichen TF (118), gefolgt von einer Transmembrandomäne (Aminosäuren 220-242) und einer relativ kleinen carboxylterminalen Intrazellulärdomäne (Aminosäuren 243-263) (93, 121). Der extrazelluläre Anteil dient als Rezeptor für den Gerinnungsfaktor VII/VIIa, was auch durch Röntgenstrukturanalysen gezeigt werden konnte (8). Die Transmembrandomäne vermittelt die Phospholipidverankerung von TF, während die intrazelluläre Domäne des TF wahrscheinlich für den zellulären Transport und die gerichtete, polarisierte Expression von TF verantwortlich ist; für die Kofaktorfunktion des TF ist sie jedoch entbehrlich (20).

### **1.2.3. TF als Zellmembranrezeptor mit Einfluss auf intrazelluläre Prozesse**

Die Analyse der Charakteristika seiner Sekundärstruktur zeigt strukturelle Verwandtschaft von TF mit den Rezeptoren für Zytokine und hämatopoetische Wachstumsfaktoren. Die Ähnlichkeiten rechtfertigen eine Klassifizierung von TF in die Familie der Zytokinrezeptoren, die auch die Interferon- $\alpha/\beta$ - und - $\gamma$ -Rezeptoren einschließt. Ansonsten zeigt TF keine signifikante Ähnlichkeit mit irgendeinem anderen bekannten Protein (9, 99).

Zunächst wurde anhand von messbaren Veränderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Stimulation mit Faktor VII in Anwesenheit von TF (116) von einer direkten TF-assoziierten intrazellulären Signalübertragung berichtet. Neuere Befunde zeigen, dass Faktor VIIa in der Tat TF-abhängige zelluläre Interaktionen induzieren kann, die unabhängig von der dabei nachfolgend auflaufenden Aktivierung der Gerinnungskaskade sind (21). Der Vorgang ist aber in jedem Falle gänzlich abhängig von der Anwesenheit des TF auf der Zelloberfläche. Wie aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit Zytokinrezeptoren zu vermuten, ist TF dabei für F VII als Ligand wirklich der Rezeptor, der an der Signalübertragung vom extrazellulären Milieu ins Zellinnere beteiligt ist (22, 108, 116): TF interagiert über den zytoplasmatischen Teil mit dem Zytoskelett und vermag so nachfolgend in TF exprimierenden Zellen intrazelluläre Signalwege zu beeinflussen (118).

Des Weiteren können intrazelluläre Vorgänge aber auch unabhängig vom Vorhandensein der zytoplasmatischen Domäne (105) durch die TF-abhängige Bindung von

Faktor VII an der Zellmembranoberfläche induziert werden. Ein solcher Mechanismus ist z. B. bei der TF-abhängigen Internalisation von an TF gebundenem F VIIa via Endozytose zu beobachten. Dieser aktive Prozess beinhaltet entsprechende intrazelluläre Vorgänge, für deren Aktivierung die zytoplasmatische Domäne des TF keineswegs benötigt wird (53).

Die Rezeptor-Ligand-Bindung von TF mit Faktor VIIa triggert z. B. den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation in verschiedenen Zelltypen (110, 111) wohl über einen Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase-C-abhängigen Weg (22, 108); es können direkte proinflammatorische Effekte über die Induktion von Sauerstoffradikalen bewirkt (29, 119) und diverse Transkriptions- und Wachstumsfaktoren aktiviert werden (19).

#### **1.2.4. Bedeutung des TF in der Embryonalentwicklung**

Es steht außer Frage, dass TF bereits in der frühen Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle spielt: Die Inaktivierung des TF-Gens in der Maus führte zu einem Absterben des Embryos in utero. Die homozygot TF-negativen Embryos starben zwischen 8,5 und 10,5 Tagen post conceptionem infolge von hämorrhagischen Blutungen mit Austritt von embryonalen Erythrozyten aus den extraembryonalen und embryonalen Gefäßen nach Verlust ihrer vaskulären Integrität. TF scheint eine wesentliche Rolle in der Aufrechterhaltung eines funktionellen extraembryonalen Dottersackgefäßbetts zu haben, das entscheidend zur Ernährung der Embryos in dieser Zeit beiträgt. Wegen dieser wichtigen Funktion in der Embryonalentwicklung sind wahrscheinlich auch bis jetzt keine wesentlichen Deletionen im TF-Gen bzw. genetische Defekte bezüglich TF beim Menschen gefunden worden. Es besteht die allgemein akzeptierte Annahme, dass die Abwesenheit von TF nicht mit dem Leben vereinbar ist. Dies unterstreicht noch einmal die nicht unerhebliche physiologische Bedeutung von TF in der Hämostase (18, 23, 134).

### **1.3. Expression von TF**

#### **1.3.1. Nachweismethoden**

Als Zelloberflächenrezeptor kann TF mittels In-situ-Hybridisierung und anderer immunhistochemischer Methoden in vielen Geweben aufgespürt werden, wobei sich eine zelltypische Verteilung zeigt. So konnten Drake und Fleck für die menschliche Niere immunhistochemisch nachweisen, dass in den Glomerula TF exprimiert wird (36, 42, 140).

#### **1.3.2. Schutzfunktion gegen Blutverluste**

Unter Normalbedingungen kann auf peripheren Blutzellen und auf Endothelzellen mit immunhistochemischen Methoden kein intravaskulärer TF detektiert werden; in Fibroblasten der Adventitia arterieller und venöser Gefäße ist TF hingegen deutlich nachweisbar und auch die glatten Muskelzellen in der Gefäßwand sind TF-positiv, besonders nach einer traumatischen Schädigung (39, 85, 87).

Durch das Fehlen von TF im Blut selbst und durch die nach innen hin aufgrund der Endothelzellen normalerweise wenig gerinnungsaktive Gefäßwand besteht also eine physiologische Barriere zwischen TF einerseits und den im Blut zirkulierenden Gerinnungsfaktoren andererseits: Unter physiologischen Bedingungen kann durch die räumliche Trennung keine Gerinnungsaktivierung durch TF stattfinden. TF dient aber als hämostatischer Umschlag um die Gefäßstrukturen von außen herum, so dass durch ihn im Falle einer Gefäßschädigung die Initiierung der Blutgerinnung bewirkt wird, was als Schutzfunktion gegen Blutverluste aufgefasst werden kann (36, 42, 87).

Die ohne besondere Stimulation bereits TF-positiven Zellen sind meist Stützzellen ihres Gewebes, wie die Astrozyten im Gehirn oder die Stromazellen in der Plazenta. Bei vielen Organen sind zwar in der Zellkultur die Parenchymzellen selbst und deren Fibroblasten TF-positiv, erweisen sich aber in vivo unstimuliert TF-negativ. Eine besondere Ausnahme liegt bei den Fibroblasten in Organkapseln vor, die auch in vivo immunhistochemisch deutlich TF-positiv sind (36, 42, 85).

### **1.3.3. TF-Expression unter pathologischen Bedingungen**

Unter pathologischen Bedingungen ist in vivo die TF-Expression und die TF-Synthese in solchen Zellen, die normalerweise kein TF exprimieren, durch diverse Substanzen induzierbar, inklusive Endotoxin, proinflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren (37, 38). So können ruhende Endothelzellen, die keinen TF exprimieren, in einer Entzündungsreaktion so stimuliert werden, dass der TF-Level der Zelle hochreguliert und die prokoagulatorische Aktivität steigt (12, 27, 28, 90, 96). Auch Monozyten können durch Stimulation mit Zytokinen zu einer TF-Expression angeregt werden (51).

Zusammenfassend lässt sich herausstellen, dass TF generell nur in den Zellen konstitutiv exprimiert wird, die unter physiologischen Bedingungen nicht mit dem Blut und damit nicht mit den zirkulierenden Gerinnungsfaktoren wie Faktor VII in Kontakt kommen, es sei denn, es liegt eine unphysiologische Situation vor, z. B. eine traumatische Schädigung oder Entzündungsreaktion. Die normalerweise bestehende räumliche Trennung ist daher ein wichtiger Regulationsmechanismus für die Gerinnungsaktivierung durch TF, der auch als Kompartimentalisierung bezeichnet wird (36, 42).

### **1.3.4. TF bei Sepsis und disseminierter intravasaler Gerinnung**

Erhöhte Konzentrationen von prokoagulatorisch aktivem TF wurden im Plasma von Patienten gefunden, die an Endotoxin-induzierter disseminierter intravasaler Gerinnung erkrankten (63, 136), ebenso im Plasma von Patienten, bei denen eine maligne Tumorerkrankung bekannt war (25, 65). Es konnte gezeigt werden, dass durch die Infusion von aufgereinigtem TF eine disseminierte intravasale Gerinnung im Tiermodell initiiert ist (137). Weiterhin wurde anhand von Inhibitionsstudien beobachtet, dass TF-Blockade durch einen Antikörper den Verlauf der Erkrankung positiv beeinflussen konnte (127). Dies alles unterstreicht die wichtige Rolle von TF in Bezug auf Koagulopathie und Multiorganversagen im Endotoxinschock (77, 123). Es ist aus Untersuchungen an Pavianen (Affen) bekannt, dass im letal endenden septischen Schock, der durch E. coli ausgelöst wurde, auch Epithelzellen aus Nierenglomerula eine gesteigerte TF-Expression aufwiesen (35).

## **1.4. Prokoagulatorische Aktivität und Tissue Factor in der Niere**

### **1.4.1. Glomeruläre Fibrinablagerungen bei entzündlichen Nierenerkrankungen**

Schon vor Jahren wurde die Ausbildung von Blutgerinnseln und Fibrinablagerungen innerhalb des Glomerulums mit entsprechender Thrombosierung von Kapillaren verdächtigt, auch maßgeblich an der Entwicklung von glomerulären Schädigungen beteiligt zu sein (68, 135). Möglicherweise kann Fibrin seine schädlichen Effekte durch eine direkte zytotoxische Wirkung, durch Beeinträchtigung der glomerulären Hämodynamik sowie durch die Chemotaxis von Leukozyten ausüben.

Die Ablagerung von Fibrin findet sich sowohl innerhalb als auch um das Glomerulum herum – sie stellt sich dabei als eine typische histopathologische Manifestation dar, z. B. auch bei der membranproliferativen Glomerulonephritis oder bei der Lupus-Nephritis (48). Bei der Immunglomerulonephritis kann die Ablagerung von Fibrin von der Ausbildung der fibrinolytischen Aktivität des Glomerulums abhängig sein (143), im Rahmen einer durch Quecksilberchlorid induzierten Autoimmunglomerulonephritis konnte speziell beobachtet werden, dass ausgeprägte Fibrinansammlungen durch eine hohe prokoagulatorische Aktivität angeregt wurden, die ihren Ursprung selbst im Glomerulum hatte (66, 67), aber in keiner Korrelation zu der Anzahl im Glomerulum vorhandener Monozyten stand. Als Ursache für eine lokale Aktivierung von Gerinnungsprozessen wurde auch die Proliferation glomerulärer Zellen in Betracht gezogen (59).

Glomeruläre Fibrinablagerungen erscheinen also häufig bei den verschiedensten entzündlichen Nierenerkrankungen und tragen damit möglicherweise entscheidend zu der Ausbildung und dem weiteren Fortschreiten der jeweiligen Erkrankung bei (52, 125). Einige Beobachtungen weisen erstens darauf hin, dass TF die erhöhte prokoagulatorische Aktivität bewirkt und über das Anstoßen der Gerinnungskaskade der Initiator der Fibrinbildung im Glomerulum ist (3, 40, 48, 129). Dies korreliert auch mit der Beobachtung, dass Glomerulonephritis-Patienten eine signifikant höhere Absonderung von TF in den Urin aufweisen als gesunde Patienten (80). Zweitens scheinen durchaus ortsansässige Zellen als Quelle für die erhöhte PCA im Glomerulum in Frage zu kommen (128, 130).

#### **1.4.2. TF nach Nierentransplantation**

Ebenso wurde vermutet, dass Gerinnung und fibrinolytische Aktivität auch im Rahmen einer immunologischen Reaktion auf allogene Nierentransplantate bedeutsam werden können (41, 57). Eine mögliche Verknüpfung macht die Beobachtung wahrscheinlicher, dass die Empfänger von Nierentransplantaten höhere TF-Konzentrationen im Blutplasma aufwiesen als die damit verglichenen gesunden Freiwilligen, obwohl in der TF-Aktivität keine signifikanten Unterschiede in beiden Gruppen bestanden (86).

#### **1.4.3. Einfluss von ins Glomerulum eingewanderten Leukozyten**

Auch eingewanderte Leukozyten können zu der aus mehreren Blickwinkeln beobachteten prokoagulatorischen Aktivität beitragen, die unter bestimmten Umständen im Glomerulum auftritt. Eine Infiltration von Leukozyten wird bei diversen Formen der Glomerulonephritis oder auch während einer Transplantationsreaktion gefunden (2, 49). Dabei zeigen Monozyten bzw. Makrophagen eine ausgeprägte PCA, sobald sie mit Endotoxin, TNF- $\alpha$  oder anderen Immunmediatoren stimuliert werden (1, 142). Auch verschiedene Studien am Modell legen nahe, dass eingewanderte Monozyten mittels der Expression von TF eine erhöhte glomeruläre PCA vermitteln können (60, 130, 132).

### **1.5. Prokoagulatorische Kapazität der Mesangiumzellen**

Es ist bereits vermutet worden, dass die Mesangiumzellen zwischen den Kapillarschlingen des Glomerulums zu der beobachteten Ausbildung der prokoagulatorischen Aktivität von sich aus beitragen. So konnte gezeigt werden, dass aus Rattennieren gewonnene und in Kultur gehaltene Mesangiumzellen in der Lage sind, eine wohl TF-assoziierte prokoagulatorische Aktivität in einer Entzündungsreaktion zu entwickeln (139). Auch bei humanen Mesangiumzellen in Kultur erhöht sich nach der Stimulation mit IL-1 $\beta$  die Expression des TF-Gens zeitabhängig (48).

Somit könnten mittels z. B. proinflammatorischer Zytokine stimulierte Mesangiumzellen durchaus direkt an einer erhöhten Freisetzung einer TF-bedingten prokoagulatorischen Aktivität beteiligt sein. Des Weiteren zeigt eine erst kürzlich erschienene Studie (102), dass MZ auch Faktor V nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  exprimieren.

## **1.6. Fragestellung**

In meiner Arbeit soll beleuchtet werden, inwiefern die Mesangiumzellen der menschlichen Niere in der Lage sind, TF und TF-Aktivität zu generieren, vornehmlich unter inflammatorischen Bedingungen, wie diese auch bei verschiedenen entzündlichen Nierenerkrankungen vorherrschen.

Wie beeinflussen verschiedene Zytokine, besonders IL-1 $\beta$ , das von diversen Zellen, wie z.B. Monozyten und Makrophagen, während der Entzündungsreaktion gebildet und abgegeben wird, die Produktion und Freisetzung von TF sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in den Mesangiumzellen? Welche Konsequenzen ergeben sich aus dieser Stimulation für die TF-bedingte prokoagulatorische Aktivität der Mesangiumzellen gerade auch im Kontext ihres apoptotischen Untergangs?

Darüber hinaus sollen ansatzweise intrazelluläre Mechanismen für eine die PCA beeinflussende gesteigerte oder gehemmte TF-Produktion in Analogie zu bekannten Mechanismen in anderen Zellpopulationen beleuchtet werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Laborgeräte**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Laborgeräte verwendet:

- Sterilbank Lamin Air HA 2472 GS; Heraeus [Hanau]
- CO<sub>2</sub>-begasbarer Brutschrank Heraeus [Osterode]
- Zentrifugen Biofuge 28RS mit Rotor #3042;  
Heraeus [Osterode]  
UEC-Forec III Mikroliterzentrifuge;  
UniEquip [Martinsried/München]  
Modell TJ-6 Zentrifuge; Beckman [München]
- Mikroskope III RS; Zeiss [Jena]
- Feinwaage LP 1200S und RC 210D; Sartorius [Göttingen]
- Thermoblock Dri Block DB 2A; Techne [Darmstadt]
- RNA-Photometer Gene Quant II RNA/DNA Calculator;  
Pharmacia Biotech [Freiburg im Breisgau]
- PCR-Cycler UnoII; Biometra [Göttingen]
- Elektrophoresekammer A 4581; Biometra [Göttingen]
- Strom- und Spannungsquelle Power Pack P25; Biometra [Göttingen]
- Videodokumentationsanlage UV-Tisch mit CCD-Kamera, Bildausgabe via PC  
an Diskettenlaufwerk oder Thermoprinter;  
MS Laborgeräte [Heidelberg]
- Datenverarbeitungssoftware für Agarosegele BioImage Intelligent Quantifier (V 2.1.2a);  
B. I. System Corporations [Ann Arbor, MI, USA]
- 96-Well-Platten-Washer Columbus plus Washer M814R;  
Tecan [Crailsheim]
- ELISA-Reader MR 4000; Dynatech [Bonn] mit Software ELISA-  
Auswertesoftware V1.0; IBL [Hamburg]

- Spectra Mini mit Software Win Fitting (V 6.0); Tecan [Crailsheim]
- FACScan Flow Cytometer Becton Dickinson [Mountain View, CA, USA] mit Unix-Rechner und Facs-Software Lysis II; Hewlett Packard [San Diego, CA, USA]
- Wasserbad, pH-Meter, Magnetrührer, Vortexer, Bunsenbrenner, Mikrowelle u. a.

## 2.2. Materialien

### 2.2.1. Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien, die nicht separat aufgeführt werden, stammen von den Firmen Sigma [Deisenhofen]; Calbiochem [Bad Soden]; Gibco [Karlsruhe] und Merck [Darmstadt].

#### 2.2.1.1. Stimulanzen

- Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), rekombinant, aus E. coli, Boehringer Mannheim [Mannheim]
- Lipopolysaccharid (LPS) von E. coli, Sigma [Deisenhofen]
- Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- $\alpha$ ), Calbiochem [Bad Soden]
- Calphostin C, Proteinkinase-C-Inhibitor, Calbiochem [Bad Soden]
- 1,2-Dioctanoyl-sn-Glycerol (DOG), Calbiochem [Bad Soden]
- Thapsigargin (TG), Calbiochem [Bad Soden]
- BAPTA/AM, Calbiochem [Bad Soden]
- KT-5720, Proteinkinase-A-Inhibitor, Calbiochem [Bad Soden]
- 8-bromo-cyclo-Adenosinmonophosphat (8-bromo-cAMP), Calbiochem [Bad Soden]
- Forskolin, Aktivator der Adenylatzyklase, Sigma [Deisenhofen]
- Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 10 M, Merck [Darmstadt] zur Apoptoseinduktion

### 2.2.1.2. Reagenzien für RT-PCR

- $\beta$ -Mercaptoethanol, Merck [Darmstadt]
- QIAshredder, Qiagen [Hilden]
- Rneasy Mini-Kit, Qiagen [Hilden]
- Rnase-free DNase Set, Qiagen [Hilden]
- DNase I (10U/ $\mu$ l), RNase-frei, Boehringer Mannheim [Mannheim]
- MMLV Reverse Transkriptase (50 U/ $\mu$ l), Kit mit 10x Reaktionspuffer (0,5 M Tris-HCl (pH 8,3), 0,75 M KCl, 0,03 M MgCl<sub>2</sub>), Stratagen [Heidelberg]
- Random Primer (pd(N)6), Biometra [Göttingen]
- Taq-DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l) von *Thermus aquaticus* YT1, Set mit 10x PCR-Puffer ohne Mg und 50 mM Magnesium-Chlorid, Gibco [Karlsruhe]
- d NTPs (je 10mM), New England BioLabs [Beverly, MA, USA]
- peqGold Universal Agarose, peqlab Biotechnologie [Erlangen]
- Ethidiumbromid (1mg/ml), Sigma [Deisenhofen]
- $\Phi$ X174 DNA Hae III Digest (446  $\mu$ g/ml), Sigma [Deisenhofen]  
Fragmentgrößen (Basenpaare) 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72

### 2.2.1.3. Reagenzien für Proteinanalysen

- Bio-Rad Protein Assay, BioRad [München]
- Imubind Tissue Factor ELISA Kit, American Diagnostica [Pfungstadt] mit Meerrettich-Peroxidase (HRP-Enzym-Konjugat) und Tetra-Methylbenzidin-Chromgen-Substrat (TMB-Substrat)
- Actichrome TF Activity Assay, American Diagnostica [Pfungstadt] mit Spectrozyme-fVIIa-Lösung

### 2.2.1.4. Reagenzien für durchflusszytometrischen Apoptosenachweis

- Propidiumjodid (PI), Sigma [Deisenhofen]
- FACS Flow, Becton Dickinson [Heidelberg]

### 2.2.1.5. Allgemein benutzte Reagenzien

- PBS mit oder ohne Kalzium und Magnesium, Biochrom Seromed [Berlin]
- Bovines Serum Albumin Fraktion V (BSA), Merck [Darmstadt]
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Lösungsreagenz), Merck [Darmstadt]

### 2.2.2. Serum für die Zellkultur

- Fötale Kälber-Serum (FCS), Endotoxin < 0,01 ng/ml, Biochrom Seromed [Berlin]  
Zur Inaktivierung des Komplementsystems wurde das Serum 30 Minuten auf 56°C erwärmt, in 25-ml-Portionen aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -20° gelagert.

### 2.2.3. Kulturmedium und Puffer

#### 2.2.3.1. Kulturmedium für Mesangiumzellen

Das Grundmedium RPMI 1640 Medium (Biochrom Seromed [Berlin]) wurde mit folgenden Zusätzen ergänzt (Endkonzentration im Medium in Klammern):

- 5 ml L-Glutamin (1 mM) , GibcoBRL [Karlsruhe]
- 5 ml Penicillin (50 U/ml) / Streptomycin (50 µg/ml), Biochrom Seromed [Berlin]
- 5 ml nichtessentielle Aminosäuren, GibcoBRL [Karlsruhe]
- 5 ml Natrium-Pyruvat (1 mM), GibcoBRL [Karlsruhe]
- Rinderinsulin (5µg/ml), Transferrin (5 mg/ml), Selenit (5 ng/ml),  
Sigma [Deisenhofen]
- 0,5% (zur Wachstumsarretierung) oder  
10% (zur Proliferation) bzw. 20% (für Primärkultur) fötales Kälber-Serum (FCS)

#### 2.2.3.2. Einfriermedium

Mesangiumzellen, die in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden sollten, wurden in FCS aufgenommen, dem 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt war.

### **2.2.3.3. Trypsin/EDTA-Lösung**

Trypsin/EDTA-Lösung diente zum Abbauen der adhärennten Mesangiumzellen. Die Stammlösung (Biochrom Seromed [Berlin]) wurde in der Zellkultur und für biologische Experimente für die RT-PCR in Originalkonzentration (0,5 / 0,2 g/l) eingesetzt; für biologische Experimente zum durchflusszytometrischen Apoptosenachweis und in der Primärkultivierung wurde die Stammlösung im Verhältnis 1:10 mit PBS ohne Ca/Mg verdünnt.

### **2.2.3.4. Kollagenase-Lösung (2mg/ml)**

- 14 mg Kollagenase Typ 1 (Biochrom Seromed [Berlin]) wurden in 7 ml PBS ohne Ca/Mg aufgenommen und durch 0,2-µm-Sterilfilter (Schleicher & Schnell [Dassel]) gegeben. Die Lösung wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt eingesetzt.

### **2.2.3.5. RLT-Lysisbuffer**

- 10 µl β-Mercaptoethanol wurden je einem Millimeter RLT-Lysisbuffer (im Rneasy Mini Set enthalten) zugegeben.

### **2.2.3.6. RPE-Puffer**

- 44 ml Ethanol (99,8%) wurden der im Rneasy Mini Set enthaltenen Flasche mit „RPE-Buffer“ zugesetzt.

### **2.2.3.7. TrisHCl (10 mM)**

- 1,576 g TrisHCl (Sigma [Deisenhofen])
- 1000 ml Aqua bidest.

### **2.2.3.8. TAE-Puffer (50fach)**

- 500 ml Aqua bidest.
- 9300 mg EDTA (Sigma [Deisenhofen]), pH 8,0 (500 mM Endkonzentration)
- 121 g Tris (Sigma [Deisenhofen])
- 28,6 ml Eisessig (Merck [Darmstadt])

Eine einfache Lösung wurde hergestellt durch Verdünnung mit Aqua bidest. im Verhältnis 1 zu 20.

#### **2.2.3.9. Laufpuffer für Gelelektrophorese**

- TAE (einfach)
- 20% Glycerol
- 0,25% Bromphenolblau

#### **2.2.3.10. TBS**

- 1000 ml H<sub>2</sub>O
- 15 g TrisHCl
- 36 g NaCl
- 19 g KCl (pH 8,5)

#### **2.2.3.11. 1%iges Triton-X-100**

- 100 ml TBS
- 1 ml Triton-X-100, Merck [Darmstadt]

#### **2.2.3.12. Waschpuffer für ELISA**

- 1000 ml Aqua bidest.
- PBS (in Trockenform im TF-ELISA-KIT enthalten)
- 4 ml Detergenz (im TF-ELISA-KIT enthalten)

#### **2.2.3.13. Sample Buffer für ELISA**

- 100 ml Waschpuffer
- 1 g BSA

**2.2.3.14. Enzym Conjugate / Enzym Conjugate Diluent**

- 20 ml Aqua bidest. wurden mit dem „Enzym Conjugate Diluent“ vermischt, 12 ml dieser Flüssigkeit wurden 12 µl „HRP-Enzym Conjugate“ (Meerrettich-Peroxidase) zugegeben.

**2.2.3.15. Natriumacid**

- 500 ml PBS mit Kalzium und Magnesium
- 0,05% (250 mg) Natriumacid ( $\text{NaN}_3$ ), Merck [Darmstadt]
- 250 µl FCS

**2.2.3.16. 4%iger Paraformaldehyd-Puffer**

- 100 ml PBS mit Kalzium und Magnesium
- 4000 mg Paraformaldehyd, Sigma [Deisenhofen]
- der pH wurde bei 7,4 eingestellt

**2.2.3.17. Saponin-Puffer**

- 98 ml PBS mit Kalzium und Magnesium
- 100 mg Saponin, Sigma [Deisenhofen]
- 2 ml Hepes (1M), Biochrom Seromed [Berlin]
- 1000 mg BSA

Der pH wurde bei 7,4 eingestellt

#### 2.2.4. Primer für RT-PCR

Die in der RT-PCR verwendeten Primer wurden von Biometra [Göttingen] synthetisiert, im molekularbiologischen Grad aufgereinigt und lagen in einer Konzentration von 0,1 nmol/ $\mu$ l vor.

Die Sequenzen wurden nach Eingabe der Original-DNA-Sequenzen von Tissue Factor (84) mit entsprechender Software ermittelt; für  $\beta$ -Aktin lag eine entsprechende Sequenz aufgrund vorangegangener Experimente bereits vor (75).

Sequenz 5'-3' der Primer:

- Tissue Factor Primer 1: TAT CAC AGC CCT CTT CAC ACA TT
- Tissue Factor Primer 2: CCC CTT CTT TTC ACC ATT CCT A
- $\beta$ -Aktin Primer 1: ATG GAT GAT GAT ATC GCC GCG
- $\beta$ -Aktin Primer 2: TCT CCA TGT CGT CCC AGT TG

#### 2.2.5. Plastikmaterialien

- Die Plastikmaterialien wurden von den Firmen Greiner [Frickenhausen] und Eppendorf [Hamburg] bezogen, soweit in nachfolgenden Kapiteln nicht anders aufgeführt.

## **2.3. Zellkulturmethoden**

### **2.3.1. Gewinnung und primäre Kultivierung humaner Mesangiumzellen**

Die humanen Mesangiumzellen wurden aus dem gesunden Teil tumornephrektomierter Nieren isoliert. Nach Entfernung von Nierenkapsel und Nierenmark wurde die Nierenrinde – in kleine Stücke geschnitten – nacheinander folgend durch drei verschiedene Metall-Maschen-Siebe (Retsch [Haan/Rheinland]) unter ständiger Zugabe von PBS mit Ca/Mg verrieben (58). Die glomerulären Kapseln und die tubulären Bruchstücke verblieben dabei in den ersten beiden Sieben mit einer Porengröße von 450  $\mu\text{m}$  und 180  $\mu\text{m}$ . Während Blutzellen ungehindert alle 3 Siebe passierten, fing das letzte Sieb (125  $\mu\text{m}$ ) die kapsellosen Gomerula auf, die dann mit vorgewärmter Kollagenaselösung (1mg/ml) für 40 min bei 37°C unter ständigem Schütteln angedaut wurden. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation mit 180 x g für 10 min bei 4°C, der Überstand wurde verworfen. Nach zwei Waschschrinen mit PBS mit Ca/Mg (Zentrifugation 10 min, 100 x g) wurden die Zellen in 20%igem FCS-Medium aufgenommen; nach 5 Tagen Inkubation im Brutschrank waren sie adhärenent. Eine hohe Reinheit zeigte sich bereits in der ersten Passage im Mikroskop anhand der typischen Zellmorphologie (sternartige Zell-Ausläufer und -Fortsätze). Da die Zellen erst später zur weiteren Kultivierung ein Medium mit 10%igem Anteil erhielten, trug die 20%ige FCS-Konzentration in den ersten 2 Wochen zur Steigerung der Reinheit bei, da sie für Fibroblasten, die den Hauptanteil der Kulturverunreinigung ausmachten, toxisch ist. Die vereinzelt Kolonien von weniger adhärenenten epithelialen Zellen wurden außerdem abgeschabt bzw. behutsam mit 1 zu 10 verdünnter Trypsin/EDTA-Lösung (0,005%/0,002%) abgedaut, während die stark adhärenenten Mesangiumzellen letztlich in Reinkultur vorlagen.

### **2.3.2. Immortalisierte humane Mesangiumzellen**

Die in dieser Arbeit mit einem hohen Anteil durchgeführte Methode der semi-quantitativen PCR erforderte eine große Menge an Zellmaterial für die nach Stimulation zur Messung und Ergebnisergebnisgewinnung notwendige Präparation der RNA.

Das zur Präparation und Kultivierung einsetzbare Nierengewebe wurde aber durch die Anzahl der durchgeführten Tumornephrektomien begrenzt, so dass im Verlauf der Arbeit neben dem Zellmaterial aus der Kultivierung frisch präparierter Mesangiumzellen auch eine entsprechend transfizierte, immortalisierte Zelllinie zum Einsatz kam. Es wurden jedoch weiterhin alle Experimente zur Kontrolle auch an nicht-transfizierten MZ durchgeführt.

Die immortalisierten humanen Mesangiumzellen wurden über Bernhard Banas von der Ludwig-Maximilian Universität München bezogen. Die Immortalisierung wurde mittels stabiler Transfektion des Simian-Virus-40-T-Antigens erreicht (7). Nachfolgend wurde die Zelllinie durch indirekte Immunfluoreszenzuntersuchungen charakterisiert, hier zeigte sich eine positive Anfärbbarkeit gegenüber Fibronectin, Aktin aus glatten Muskelzellen,  $\beta$ 1-Integrin der  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 5-Ketten und gegenüber dem Simian-Virus-40-T-Antigen. Die transfizierten Mesangiumzellen waren hingegen negativ gegenüber Faktor VIII, Zytokeratin, von-Willebrand-Faktor und Desmin. Ihre weitere Kultivierung war identisch mit der Kultivierung der humanen Mesangiumzellen aus der Primärkultur. Unter Beachtung dieser Marker zeigt die Zelllinie identische Merkmale im Vergleich zu nicht-transfizierten humanen Mesangiumzellen; zudem konnten kontraktile Fähigkeiten als Antwort auf Stimulation mit Angiotensin II nachgewiesen werden. Die meisten Experimente wurden, wenn nicht anders erwähnt, mit transfizierten Mesangiumzellen durchgeführt, wobei Kontrollen mit frisch isolierten nicht-transfizierten hMZ keine signifikanten Unterschiede ergaben.

### **2.3.3. Kultivierung und Passage**

Die Kultivierung aller Mesangiumzellen erfolgte im CO<sub>2</sub>-begasbaren Brutschrank bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre und bei 8% CO<sub>2</sub>-Gehalt. Alle 3-4 Tage wurde das Kulturmedium durch auf 37°C vorgewärmtes neues 10%iges Medium ersetzt. Für die Zucht erhielt eine 250-ml-Kulturflasche mit 75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche 15 ml Medium, die 50-ml-Kulturflaschen für Experimente mit 25 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche erhielten 5 ml Medium.

Die in den Kulturflaschen konfluent gewachsenen Zellen wurden mit Ca/Mg freiem PBS gewaschen und mittels auf 37°C vorgewärmter Trypsin/EDTA-Lösung (0,5/0,2

g/l) unter mikroskopischer Kontrolle vom Kulturflaschenboden abgelöst. Nach einem Waschschrift mit nicht zu warmem 10%igem FCS-Medium (Zentrifugation 10 min, 100 x g) wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 oder 1:3 in neue Flaschen subkultiviert.

#### **2.3.4. Wachstumsarretierung vor Experimenten**

Zur Wachstumsarretierung vor Stimulation für nachfolgende Experimente wurden die konfluenten Zellen über einen Zwischenschritt mit 3,33%igem FCS-Medium für 3 Tage in 0,5%igem FCS-Medium gehalten. Beim Wechsel zu einem Medium mit niedrigerem FCS-Anteil wurde zuvor mit PBS mit Ca/Mg gewaschen. Für die Experimente kamen Zellen aus den Passagen 3-6 zum Einsatz.

#### **2.3.5. Konservierung der Zellen in flüssigem Stickstoff**

##### **2.3.5.1. Einfrieren**

Die abgelösten Zellen aus einer 50-ml- Kulturflasche (25 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche) wurden in 1,5 ml eiskaltem DMSO-haltigen Einfriermedium aufgenommen und – in Einfrierampullen (Greiner [Frickenhausen]) überführt – über Nacht im –80°C-Gefrier-schrank in einem mit Isopropanol gefüllten Einfriergefäß langsam weiter heruntergekühlt. Anschließend wurden die Ampullen in flüssigem Stickstoff konserviert.

##### **2.3.5.2. Auftauen**

Die eingefrorenen Ampullen mit den konservierten Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff direkt in ein Wasserbad gegeben und bei 37°C unter vorsichtigem Schütteln aufgetaut. Die Zellsuspension wurde daraufhin in 10 ml 20%igem FCS-Medium aufgenommen und mit 100 x g für 10 min zentrifugiert. Nachdem der DMSO-haltige Überstand abgesaugt war, wurden die Zellen in 10 ml frischem 20%igem FCS-Medium resuspendiert und in zwei 50-ml-Kulturflaschen überführt.

## **2.4. In-vitro-Testsysteme**

### **2.4.1. RNA-Isolation aus Zellysaten**

#### **2.4.1.1. Prinzip der RNA-Isolation**

Das Prinzip der RNA-Isolation mit der Qiagen-„Rneasy“-Säule beruht auf den selektiven Bindungseigenschaften einer auf Kieselsäuregel basierenden Membran, die sich in einer zentrifugierbaren kleinen Säule befindet (Microspintechnologie). Zuerst werden die Mesangiumzellen aus je einer Kulturflasche pro Ansatz mit einem Guanidin-Isothiocyanat-Puffer, der die RNA abbauenden RNAsen durch Denaturierung sofort inaktiviert, lysiert. Eine Homogenisation erfolgt mit dem „QIAshredder“ der Firma Qiagen, einem Zerkleinerungssystem für alle Arten von biologischen Polymeren. Es befindet sich ebenfalls in einer zentrifugierbaren Minisäule. Die Homogenisation ist nötig, um die bei der Lyse aus den Zellkernen freigesetzte hochmolekulare genomische DNA zu zerschneiden, um so die Viskosität der Probe zu verringern. Da für jede Probe eine neue „QIAshredder“-Säule eingesetzt wird, werden Vermischungen der einzelnen Proben verhindert, was Grundbedingung dafür ist, dass überhaupt semiquantitative Aussagen über die TF-mRNA der einzelnen Proben getroffen werden können.

Durch Zugabe von Ethanol werden die besten Bindungseigenschaften für RNA geschaffen, so dass spezifisch die RNA aus den auf die Säule gegebenen homogenisierten Lysaten an die Membran bindet, während andere Bestandteile des Zellysates durch die verschiedenen Waschschrte aus der Säule zumeist herausgewaschen werden, bevor dann letztlich die mRNA mit reinem Wasser wieder eluiert und für die RT-PCR eingesetzt werden kann.

Um die vollständige Entfernung der genomischen DNA aus der aufzureinigenden RNA zu gewährleisten, wird die evtl. doch an der Membran gebundene genomische DNA direkt auf der Säule nach einem modifizierten „Rnase-Free DNase Set Protocol“ der Firma Qiagen verdaut. Durch nachfolgende Waschschrte wird das hierbei eingesetzte

Enzym, die DNase I, aber wieder herausgewaschen, so dass sie keinen Einfluss mehr auf die später aus der RNA durch reverse Transkription gewonnene DNA hat.

Mit diesem Verfahren wird nur RNA isoliert, die größer als 200 Nukleotide ist; dazu gehört vor allem die mittels RT-PCR weiter zu untersuchende mRNA, während die kleinere tRNA (160 Nukleotide) und die ribosomale RNA (70-120 Basen) fast nicht gebunden werden. So reichern sich längere RNA-Moleküle im Eluat an.

#### **2.4.1.2. Durchführung der RNA-Isolation**

Die adhärennten Zellen in der Kulturflasche wurden zweimal mit warmem PBS ohne Ca/Mg gewaschen. Für eine Minute wurden die Flaschen bei 37° C in einem Milliliter vorgewärmter Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle auf erfolgte Ablösung vom Flaschenboden wurde die Verdau-Reaktion durch Zugabe von 5 ml kaltem PBS ohne Ca/Ma gestoppt. Nach mehrmaligem Spülen mittels Resuspendieren in einer 10-ml-Pipette wurde die Suspension in ein 15-ml-Bluecap überführt, um sie bei 100 x g für 10 min zu zentrifugieren.

Nach Verwerfen des gesamten Überstandes wurde auf das trockene Zellpellet 1 Milliliter RLT-Lysisbuffer pipettiert, die Suspension mehrmals in der Pipette resuspendiert und anschließend für zehn Sekunden verschüttelt. 350 µl des Lysats wurden auf die violette „QIAshredder“ Säule gegeben, die für 2 min bei 13500 x g zentrifugiert wurde. Die im 2-ml-Eppi aufgefangene Flüssigkeit wurde mit 350 µl 70%igem Ethanol gut vermischt und auf die rosa Rneasy-Minisäule gegeben. Nun erfolgte die spezifische Bindung an die Kieselsäuregel-Membran in einem Zentrifugationsschritt bei 8500 x g für 1 min. Die aufgefangene Flüssigkeit wurde verworfen und die Säule mit 350 Mikroliter RW1-Puffer in einem weiteren Zentrifugationsschritt wie oben gewaschen. Für den DNA-Verdau wurden zwischenzeitlich je Ansatz 10 µl „Dnsae I stock solution“ mit 70 µl RDD-Puffer vermischt. Die Säulen wurden nach Aufpipettieren des Gemisches für 25 min bei 37°C inkubiert. Danach folgten eine Wiederholung des Waschschrattes mit RW1-Puffer und nach dem Wechsel der Auffanggefäße zwei Waschschratte mit je 500 µl RPE-Puffer. Vor Ablösen der RNA mit zweimal je 30 µl RNase-freiem Aqua bidest. wurden die Säulen bei 13500 x g für 2 min trocken zentrifugiert. Eluat wurde in einem 1,5-ml-Eppi

aufgefangen; hiervon wurden 4 µl zur Bestimmung der RNA-Konzentration entnommen und der Rest bei -80°C weggefroren.

### **2.4.2. RNA-Konzentrationsmessung**

Nach Abgleich des Nullwertes mit Tris-HCl (10 µM) wurden 4 µl RNA-Eluat mit 96µl Tris-HCl (10 µM) verdünnt und in die Mikroküvette des Gene Quant II RNA/DNA Calculator pipettiert. Zwischen den einzelnen Messungen wurde die Mikroküvette mit TrisHCl-Puffer gewaschen. Die Extinktion jeder Probe wurde bei einer Wellenlänge von 260 und 280 Nanometern bestimmt, hieraus errechnete das Gerät die Ration 260/280 als Möglichkeit zum Abschätzen der Reinheit der Proben und die RNA-Konzentration in mg/ml. Voraussetzung für die Weiterverarbeitung der Proben war eine Ration zwischen 1,8 und 2,0. Des Weiteren wurden nur Proben berücksichtigt, die maximal 25% von der Durchschnittskonzentration abwichen. Mit der Tabellenkalkulation Microsoft Exel wurde außerdem das Volumen an Aqua bidest. berechnet, das der jeweiligen Probe zugegeben werden musste, um auf einen Gesamt-RNA-Gehalt von 0,54 mg/ml zu kommen. So wurden bei der nachfolgenden Transkription in jeder Einzelprobe bei einem Gesamtvolumen von 7 µl RNA-Template genau 3,8 µg RNA in cDNA umgeschrieben.

### **2.4.3. RT-PCR: Reverse Transkription und Polymerase-Ketten-Reaktion**

#### **2.4.3.1 Prinzip der RT-PCR**

Die DNA, die im ersten Schritt der RT-PCR aus der RNA-Vorlage entsteht, wird als komplementäre DNA (cDNA) bezeichnet. Für die Synthese ist eine retrovirale reverse Transkriptase (RT) notwendig; dies ist eine Polymerase aus Retroviren (z. B. aus einem Mäuse-Leukämievirus). Sie ist in der Lage, an der RNA-Vorlage einen DNA-Strang zu synthetisieren. Das Priming bei der cDNA-Synthese wird per Zufall mit allen Kombinationen an Hexanukleotiden durchgeführt.

Die danach folgende Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine Technik zur In-vitro-Vermehrung (Amplifikation) von bestimmten ausgewählten DNA-Abschnitten. Diese Methode wurde bei Cetus in Kalifornien entwickelt; sie wurde praktisch anwendbar durch die Entdeckung der hitzestabilen Taq-Polymerase mit hohem Temperatur-optimum (72°C), die aus *Thermus aquaticus* isoliert wurde.

DNA-Polymerasen synthetisieren komplementäre DNA-Stränge in 5'-3'-Richtung an einer einzelsträngigen DNA-Vorlage, ausgehend von einer durch den Primer doppelsträngigen DNA-Region.

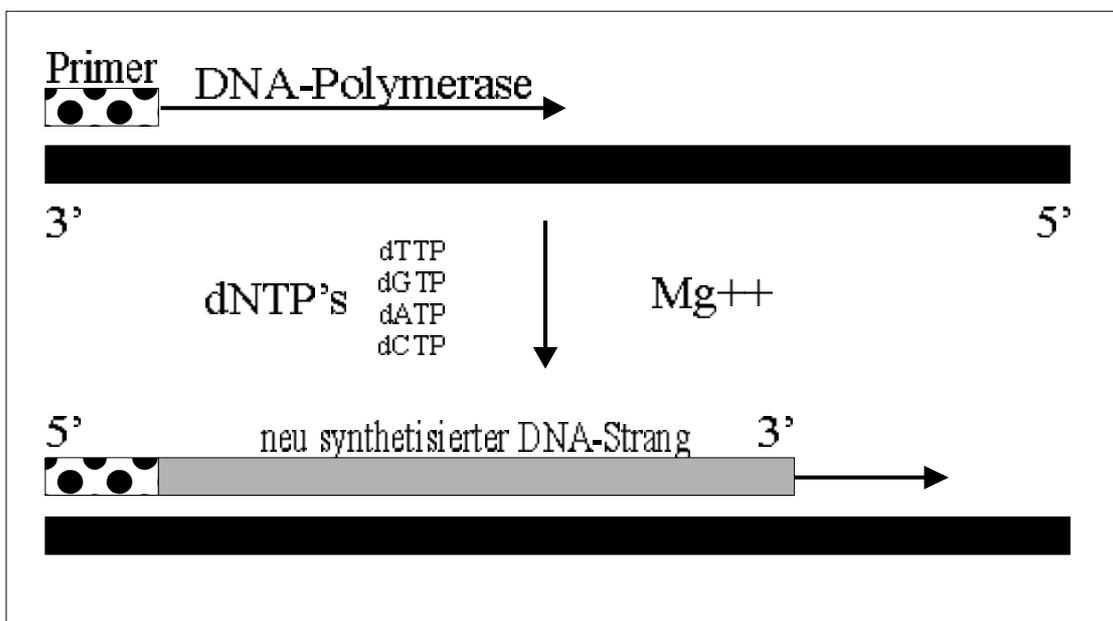


Abb. 2.1: Primer-Extension: Die DNA-Polymerase verlängert einen Primer, ausgehend von der 3'-OH-Gruppe und nutzt als Substrate die Nucleotide und Magnesiumionen, um einen zum DNA-Vorlagenstrang komplementären DNA-Strang zu synthetisieren.

Die Synthese des DNA-Stranges beginnt an einem kurzen, zu einem bestimmten Abschnitt der DNA-Matrize komplementären Oligonucleotid, dem so genannten Primer. Diese Reaktion wird daher als „Primer-Verlängerung“ oder „Primer-Extension“ bezeichnet. Zusätzlich werden hierfür vier verschiedene Desoxynucleosidtriphosphate (dATP, dTTP, dGTP und dCTP) und Magnesium gebraucht. Beim Start der Synthese bildet die Polymerase eine Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxylgruppe am 3'-Ende des Primers und der 5'-Phosphatgruppe des komplementären Desoxynucleotids. Beim Einbau der nächsten Base wird die 3'-OH-Gruppe der vorher eingebauten Base genutzt. So ergibt sich die 5'-3'-Richtung der DNA-Synthese.

Die PCR benutzt das Prinzip der Primer-Extension, aber mit zwei Primern, die jeweils komplementär zu den gegenüberliegenden Strängen einer DNA-Region sind (z. B. ein Teil der DNA-Sequenz für TF oder  $\beta$ -Aktin). Nach Denaturierung der DNA durch Hitze, d. h. Auftrennung der beiden Stränge der DNA-Matrize, können sich nach Abkühlung auf eine Temperatur um 50°C die Primer an die DNA-Matrize anlagern. Die Orientierung der Primer wird so gewählt, dass die DNA in Richtung des anderen Primers synthetisiert wird, das heißt, die Primer-Extension des Up-Primers führt zur Synthese einer Matrize für den Down-Primer und umgekehrt. Durch z. B. 25faches Wiederholen dieses Zyklus aus Denaturierung, Anlagerung und Primer-Extension ereignet sich im Thermocycler eine exponentielle Vermehrung des DNA-Fragments zwischen den beiden Primern (Haupt-PCR-Produkt); es wird von den beiden Primern flankiert und enthält sie selbst, während längere DNA-Fragmente aus der initialen DNA-Synthese, die über die Komplementärsequenz hinausgehen, nur linear akkumulieren, da die Menge an Start-DNA limitiert ist.

Zur Überprüfung der Länge und Quantifizierung des DNA-Produkts wird ein Teil des Reaktionsproduktes und ein Molekulargewichtsmarker ( $\Phi$ X174HAE III-Digest) auf ein 1,5%iges Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen. Im elektrischen Feld der Elektrophoresekammer wirkt auf die negativ geladenen Desoxyribonukleotidsäuren die Kraft  $F$ , die die Desoxyribonukleotidsäuren in Richtung des positiv geladenen Pluspols zieht. Dabei wandern die kleinen Bestandteile schneller, die großen Moleküle langsamer. Die amplifizierten DNA-Fragmente werden so nach Einlaufen in das Agarosegel durch das zwischen den aromatischen Ringsystemen der DNA interkallierende Ethidiumbromid unter UV-Transillumination als eine schmale Bande an einer ihrer Größe entsprechenden Position im Gel sichtbar, die bei Anregung durch UV-Licht orange leuchtet. So kann seine Größe durch Vergleich mit dem Marker bestimmt werden. Die Intensität der Bande dient als Maß für die ursprüngliche Menge an mRNA in der Probe im Vergleich zu den anderen Proben.

### 2.4.3.2. Durchführung der RT-PCR: RT-Schritt

Je Ansatz für eine spätere PCR-Probe wurde ein RT-Mastermix nach folgendem Schema pipettiert:

Volumen in $\mu\text{l}$	Bezeichnung
1,0	Startagen-Puffer (10x)
1,0	dNTPs (je 10mM)
0,5	pd(N)6 (Zufallsprimer)
0,5	Reverse Transkriptase o d e r Aqua bidest. als Kontrolle des DNA-Verdaus (Negativkontrolle)

Tab. 2.1: RT-Mastermix

Auf 3  $\mu\text{l}$  Mastermix wurden 7  $\mu\text{l}$  RNA-Template in entsprechend eingestellter Konzentration von 0,54 mg/ml gegeben und in einem PCR-Eppi (Biozym [Hess. Oldendorf]) nach folgendem Schema im Thermocycler behandelt:

Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Zeit in Sekunden	
23	60	Anlagerung der Zufallsprimer
37	3600	Synthese der cDNA
99	300	Inaktivierung der reversen Transkriptase
5	300	Kühlung

Tab. 2.2: Zeit- und Temperaturschema für RT-Schritt

Zumeist wurde die Umschreibung praktischerweise direkt in dreifacher Menge vorgenommen, um genügend cDNA-Material für die  $\beta$ -Aktin-PCR, TF-PCR und einen Reserveansatz zu haben.

### 2.4.3.3. Verdaukontrolle

Zusätzlich erfolgte ein Ansatz mit einem Mix ohne Reverse Transkriptase, hier wurde stattdessen Aqua bidest. zugegeben. Bei diesem Ansatz konnte keine DNA neu gebildet werden; somit eigneten sich die Proben bei nachfolgender Amplifikation des  $\beta$ -Aktin-Signals als Kontrolle dafür, ob der Verdau der genomischen RNA während der RNA-Isolation vollständig erfolgt ist, da ansonsten die Proben für die semi-quantitative

Aussage der TF-PCR nicht geeignet sind. Bei erfolgreichem Verdau erschien also bei der  $\beta$ -Aktin PCR kein Signal auf dem Agarosegel.

#### 2.4.3.4. PCR

Je Ansatz für eine PCR-Probe wurde folgendes PCR-Mastermix pipettiert:

Volumen in $\mu\text{l}$	Bezeichnung
4,0	Taq-Puffer (10x)
4,0	Primer up (10 $\mu\text{M}$ ) für $\beta$ -Aktin oder TF
4,0	Primer down (10 $\mu\text{M}$ ) für $\beta$ -Aktin oder TF
1,6	Magnesium-Chlorid (50 mM)
0,8	dNTPs (je 10mM)
25,4	Aqua bidest.
0,2	Taq-Polymerase

Tab. 2.3: PCR-Mastermix

Auf 40  $\mu\text{l}$  Mastermix wurden 10  $\mu\text{l}$  cDNA-Template aus dem RT-Schritt ins PCR-Eppi gegeben und nach folgendem Schema im Thermocycler behandelt. Die optimalen Anlagerungstemperaturen wurden für die TF-Primer bei 58°C und für die  $\beta$ -Aktin-Primer bei 55°C in Versuchen ermittelt.

Temperatur in °C	Zeit in Sekunden	
94	270	Denaturierung der DNA vorab

Zwischen 25-30 Wiederholungen (Zyklen):

94	30	Denaturierung der DNA
<b>58 für TF bzw. 55 für <math>\beta</math>-Aktin</b>	30	Anlagerung der Primer an DNA
72	60	Primer-Extension, Neusynthese der DNA (Taq-Polymerase-Temperatur optimum)

72	540	nachher
----	-----	---------

Tab. 2.4: Zeit- und Temperaturschema für PCR: Der sich in den Zyklen wiederholende Teil ist fett umrandet.

Der Thermocycler war so programmiert, dass er nach Beendigung seines Programms die Proben bei 4°C kühlte, so dass sie über Nacht im Gerät verbleiben konnten. So erfolgte entweder am gleichen Tag oder am nächsten Tag die Auftrennung der Proben im Agarosegel.

#### **2.4.3.5. Gelelektrophorese**

100 ml TAE-Puffer wurden 1,5 g Agarose zugesetzt und aufgeköcht. Nach Abkühlung auf 40-50°C wurde 10 µl Ethidiumbromid (1mg/ml) als Farbstoff zugefügt. So entstand ein 1,5%iges Agarosegel mit der Konzentration von 1 µg Ethidiumbromid pro Milliliter TAE-Puffer. Die Flüssigkeit wurde in den Gelträger gegossen, der eingehängte Kamm diente als Platzhalter für die Taschen, in welche nach Erstarren 25 µl der PCR-Proben – versetzt mit 3 µl Loading-Buffer – hineinpipettiert wurden. Weiterhin wurden 25 µl des Standard-Markers (ΦX174 DNA Hae III Digest) vorsichtig in eine Tasche pipettiert.

Die Elektrophoresekammer wurde mit TAE-Puffer auf ein Volumen von ca. 1,2 Liter aufgefüllt. Die Laufzeit in der Elektrophoresekammer betrug bei einer Spannung  $U=80$  Volt ca. 1–1,5 Stunden. Danach wurde das Gel auf einen UV-Tisch gelegt; das mit der DNA interkallierende Ethidiumbromid ließ die DNA-Banden aufleuchten, so dass mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage die Banden abfotografiert werden konnten. Der angeschlossene Computer speicherte das Foto digital auf einer Diskette ab zur späteren Quantifizierung der Banden in dem Programm „BioImage Intelligent Quantifier“.

### **2.4.4. Proteinanalysemethoden**

#### **2.4.4.1. Lyse der Zellen**

Nach 16 Stunden Inkubation wurden die Zellen zweimal mit 5 ml warmen PBS ohne Ca/Mg in der Kulturflasche gewaschen. Die Lyse erfolgte direkt in der Kulturflasche mit 2 ml 1%igem Triton-X-100. Zum Ablösen der adhärenen Zellen wurde ein Zellschaber benutzt, anschließend wurde die Flüssigkeit in ein 2-ml-Reagiergefäß überführt. Nach einer Inkubationszeit von 45 min bei 20°C und wiederholtem Resuspendieren mit einer 1-ml-Pipette erfolgte eine Highspeed-Zentrifugation für 60

Minuten bei 4°C mit 38000 x g zur Sedimentierung der Zellkerne und der nicht lysierten Zellbestandteile. 1,5 ml des Überstandes wurden dann in ein anderes Reagiergefäß überführt, während das Sediment mit dem restlichen Überstand verworfen wurde. Die Zelllysate wurden aliquotiert und für spätere Testanalysen bei -20°C aufbewahrt.

#### **2.4.4.2. Proteinbestimmung mit Bio-Rad-Reagenz**

Die Bestimmung der im Zelllysate enthaltenen Gesamtproteinmenge mit dem Bio-Rad-Reagenz basiert auf einem Farbumschlag von braun nach blau der „Coomassie Brilliant Blau G250“-Säurelösung, die nach Bindung an Protein ihr Absorptionsmaximum ausgehend von einer Wellenlänge von 495 nm (braune Farbe) hin zu einer Wellenlänge von 595 nm (blaue Farbe) wechselt und in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration verschiedene Absorptionsintensitäten (Extinktionen) aufweist.

Aus einer Stammlösung von 1mg/ml BSA in PBS ohne Mg/Ca wurde eine Standardreihe von 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 und 100 µg/ml Protein durch entsprechende Verdünnung mit PBS ohne Ca/Mg erstellt. Die Proben aus den Zelllysaten wurden 1:25, 1:50 und 1:100 mit PBS ohne Ca/Mg verdünnt. Zur Doppelbestimmung wurden 100 µl der verdünnten Proben und der Standardkonzentrationen in je zwei nebeneinander liegende Kammern einer 96-Well-Platte pipettiert.

Es wurde eine 40%ige Lösung aus dem Bio-Rad-Farbreagenz mit 60%igem Anteil von PBS ohne Ca/Mg hergestellt und davon 100 µl in jedes Well gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten und Entfernung aller Luftblasen mit einer Kanüle konnten die Extinktionen der Proben mit dem „Dynatech MR 4000“-ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 590 nm gemessen werden. Der Nullabgleich erfolgte mit einem Leerwert aus 100 µl PBS ohne Ca/Mg und 100 µl 40%igem Bio-Rad-Farbreagenz. Die Datenverarbeitungssoftware interpolierte aus den Extinktionen der Standardkonzentrationen eine Standardkurve und ermittelte unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung anhand der Standardkurve aus den Extinktionen die Original-Gesamtproteinkonzentration jeder Probe. Jede 96-Well-Platte wurde dreimal gemessen, die ausgegebenen Proteinkonzentrationen der verschiedenen Messdurchläufe wurden im

Programm Microsoft Excel gemittelt und dienen zur Normierung der im ELISA gemessenen TF-Konzentrationen.

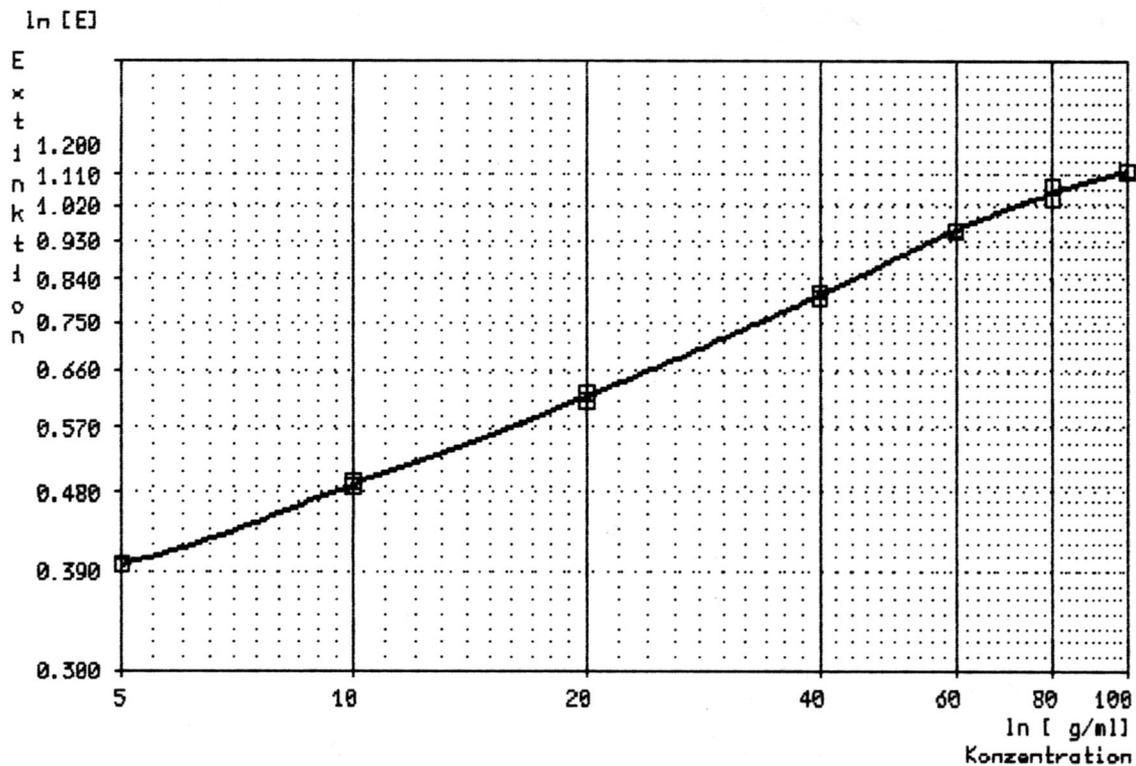


Abb. 2.2: Standardkurve Proteinmessung

#### 2.4.4.3. Prinzip der Bestimmung des TF-Proteins aus Zelllysaten

Das „Imubind Tissue Factor ELISA Kit“ ist ein immunologischer Test, der über eine enzymatische Reaktion die Menge an Tissue Factor in z. B. Zellüberständen und Zelllysaten messen kann. Dabei liegt die Nachweisgrenze bei 10 pg/ml. Der Test erkennt TF-Apoprotein, Tissue Factor und TF-FVII-Komplexe. Er ist so angelegt, dass keine Beeinflussung seitens anderer Gerinnungsfaktoren oder Inhibitoren der Gerinnung auftreten kann. Ein monoklonaler Antikörper von der Maus, der gegen menschlichen Tissue Factor gerichtet ist, dient im „Imubind Tissue Factor ELISA Kit“ als Fang-Antigen; er erkennt und neutralisiert menschliches Gewebsthromboplastin (TF).

Die Proben aus den Zelllysaten werden in verdünnter Form in den Kammern der Mikrotiterplatte inkubiert, deren Boden mit dem Antikörper beschichtet ist. Ein biotinmarkierter Antikörper erkennt dann spezifisch den gebundenen Tissue Factor. Die

dann folgende Zugabe von HRP-Enzym-Konjugat (Meerrettich-Peroxidase) vervollständigt die Formation des Antikörper-Enzym-Erkennungskomplexes. Die Peroxidase katalysiert bei Zugabe von Tetra-Methylbenzidin-Substrat dessen Konversion von einer farblosen Lösung hin zu einer blau gefärbten Lösung, die sich bei Zugabe von Schwefelsäure als Stopplösung gelb verfärbt. Der Gehalt an TF-Protein wird bestimmt durch Messung der Lichtabsorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen die Referenzwellenlänge von 620 nm. Dieses Messverfahren dient dem Eliminieren von wellenlängenunspezifischen Einflüssen auf oder in der Mikrotiterplatte. Durch Vergleich mit den bekannten Konzentrationen der Standards lässt sich so über die Standardkurve der unbekannte Gehalt an TF in den Proben ermitteln.

#### **2.4.4.4. Durchführung des ELISA**

In einem Vorversuch mit wenig Proben wurde die optimale Verdünnung der Zellysate ermittelt, bei einer Verdünnung von 1 zu 40 lagen die Proben im optimalen Extinktionsbereich zwischen 0,5 und 1,2. Somit wurden im Hauptversuch 10 µl der Probe mit 390 µl Sample Buffer verdünnt.

Von den verdünnten Proben wurden 100 µl in je zwei nebeneinander liegende Kammern der Mikrotiterplatte zur doppelten Extinktionsmessung pipettiert. Die Standards wurden zuvor laut Testanleitung (141) in Aqua bidest. aufgelöst, für 3 Minuten leicht gemischt und dann zeitgleich mit den zu untersuchenden Proben in die ersten beiden Reihen der Testplatte in aufsteigender Reihenfolge pipettiert. Nach einer Inkubation von 1,5 Stunden im Brutschrank bei 37°C wurden alle Kammern viermal im „Columbus plus Washer“ mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen und abschließend trockengesaugt. Als Nächstes folgte die Zugabe von je 100 µl „Detection Antibody“-Lösung, die in der Inkubationszeit durch Zugabe von 5,5 ml Aqua bidest. je Flasche und 3-minütiges Schütteln gebrauchsfertig gemacht wurde. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 20°C erfolgte ein erneuter Waschschrift wie oben, um allen ungebundenen „Detection Antibody“ zu entfernen. 100 µl der in der Inkubationszeit hergestellten HRP-Enzym-Konjugat-Lösung wurden in jede Kammer pipettiert und eine Stunde bei 20°C darin belassen. Nach einem weiteren Waschschrift wie oben erfolgte die Zugabe von 100 µl der TMB-Substratlösung. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion mit 50 µl

0,5-molarer Schwefelsäure (Merck [Darmstadt]) abgestoppt. Die Extinktion der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen die Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen.

Die Datenverarbeitungssoftware WinFitting erstellte durch Auftragung der Absorptions-Mittelwerte der Tissue-Factor-Standardproben gegen die entsprechende TF-Konzentration in pg/ml eine Standardkurve, und zwar für jede Platte. Die unbekannt Konzentrationen der verschiedenen Messproben wurden aus der Kurve heraus interpoliert.

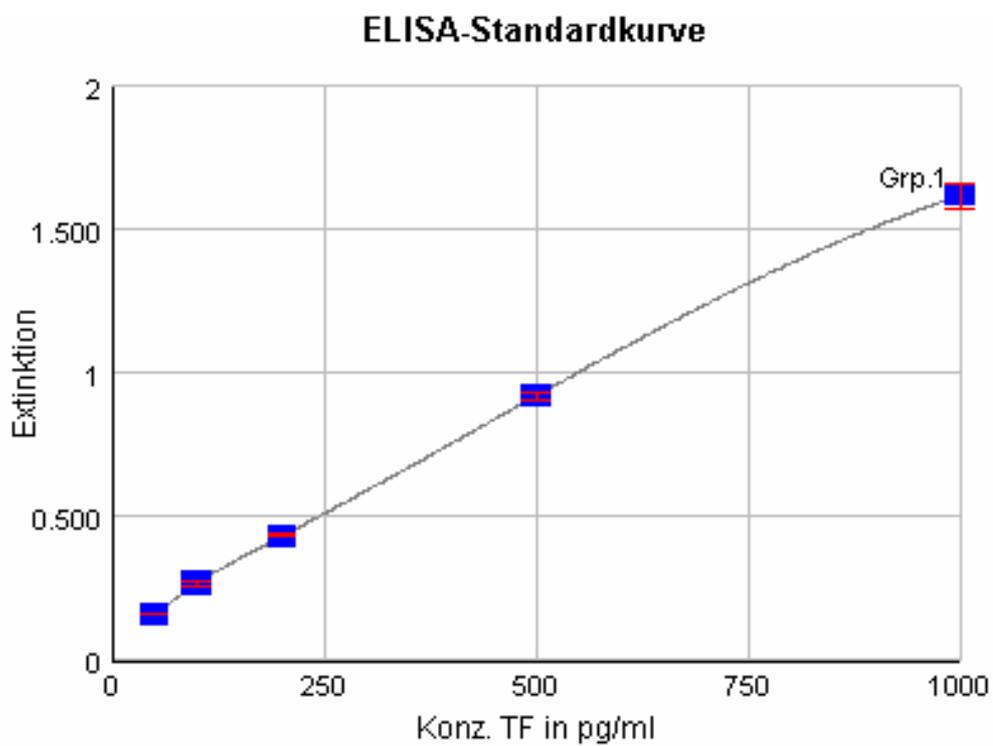


Abb. 2.3: Standardkurve TF-ELISA

## **2.4.5. Aktivitätsmessung in Überständen und in Zelllysaten**

### **2.4.5.1. Testprinzip**

Das ACTICHROME TF Activity Kit misst die Protease-Aktivität von TF, der in Zellkulturüberständen oder Lysaten enthalten ist. Dabei werden die Proben mit menschlichem Faktor VII vermischt und inkubiert, um so die Bildung von Komplexen aus TF und Faktor VII (als seinem physiologischen Substrat) zu ermöglichen. Der Komplex wird durch allosterische Änderungen aktiviert. Diese Aktivierung wird direkt gemessen anhand der Fähigkeit, die Substanz SPECTROZYME FVIIa zu spalten, die den oben genannten Reaktionsprodukten direkt zugegeben wird. SPECTROZYME FVIIa ist ein hoch spezifisches chromogenes Substrat für Komplexe aus TF und Faktor VIIa. Bei der Spaltung des Substrates werden Paranitroanilin-Farbträger in die Reaktionslösung freigesetzt, die den Farbumschlag von farblos nach gelb bewirken. Die Absorption der Lösung wird bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen und mit den Werten verglichen, die aus der Standardkurve unter Verwendung bekannter TF-Konzentrationen bzw. Aktivitäten gewonnen wurden. Der Test ist laut Aussage des Herstellers hoch spezifisch und interferiert nicht mit anderen Koagulationsfaktoren.

### **2.4.5.2. Testdurchführung**

Nach der im Kit enthaltenen Herstelleranweisung (24) wurden Probenpuffer, Faktor VII, das SPECTROZYM-FVIIa-Substrat und das TF/TFPI-freie Plasma durch Zugabe von Aqua bidest. gebrauchsfertig gemacht.

Ebenso wurde durch Zugabe von TF/TFPI-freiem Plasma ein Standard von 0,5 nM TF zubereitet; in einer Verdünnungsreihe von jeweils einem Teil nächst höher konzentrierten Standards und einem Teil TF/TFPI-freien Plasmas wurden so die restlichen Standards mit den Molaritäten 0,25, 0,125, 0,062 und 0,031 (bzw. für die Bestimmung aus Überständen auch 0,0155) hergestellt.

Die Proben aus Zelllysaten (Gesamtproteinkonzentration jeweils 0,5 mg/ml) wurden 1:20, die Zellüberstände (aus Zellkultivierung in 50-ml-Kulturflasche mit einem

Gesamtvolumen des Überstands von 2 ml) 1:1 mit Probenpuffer verdünnt und auf 37°C erwärmt. Nach Vorlegen von 25 µl Probenpuffer in jede Kammer einer 96-Well-Platte wurden 25 µl der TF-Standards bzw. 25 µl der verdünnten Proben in jeweils zwei Kammern auf der 96-Well-Platte zur doppelten Bestimmung der Proben pipettiert. Nach Zugabe von 25 µl Faktor-VIIa-Lösung wurde die Platte für 10 min bei 37°C inkubiert; danach wurden 25 µl SPECTROZYME-FVIIa-Substrat zugegeben und bis zur Extinktionsmessung nach 20 min abgelaufener Reaktion gewartet. Zur Messung wurde die Reaktion mit 0,5-molarer Essigsäure (Merck [Darmstadt]) abgestoppt. Die Messung erfolgte mit dem „Spectra Mini“-ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm.

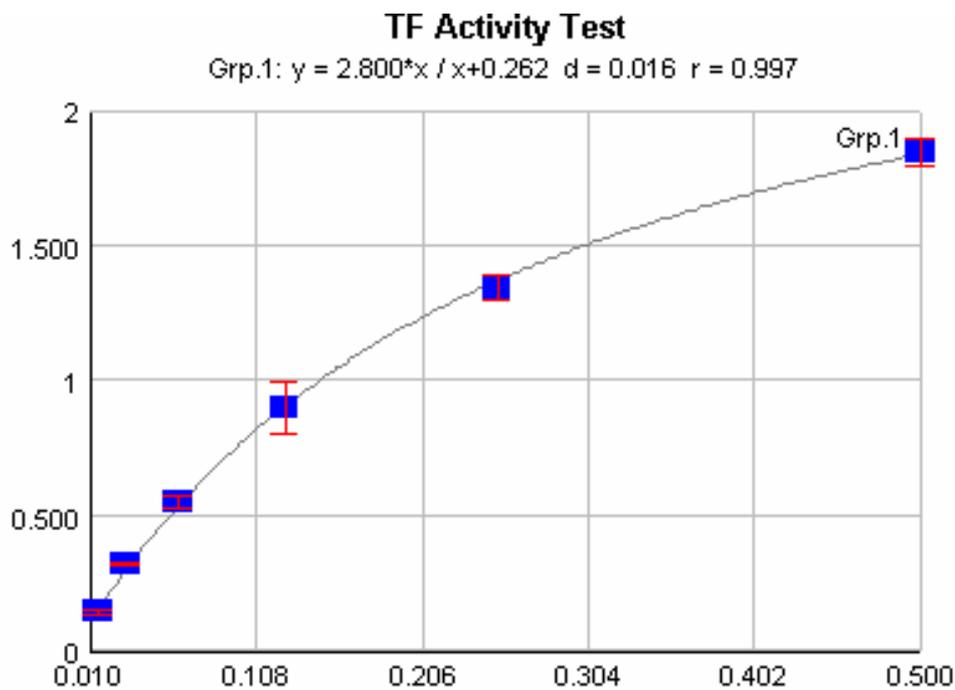


Abb. 2.4: Standardkurve für TF-Aktivitätsmessung in Zellysaten. X-Achse TF-Standard in nM, Y-Achse Extinktion bei 405 nm.

## **2.4.6. Apoptosenachweis mittels Durchflusszytometrie**

### **2.4.6.1. Prinzip des Apoptosenachweises mit Propidiumjodid**

Bei apoptotischen Zellen wird die genomische DNA schon in sehr frühen Phasen spezifisch degradiert, so dass der Gehalt an hochmolekularer DNA von apoptotischen Zellen verglichen mit vitalen Zellen abnimmt (endonukleolytische DNA-Fragmentierung). Dieses wichtige Merkmal kann nach Fixierung der Zellen und Permeabilisierung der Zellwand durch vollständige Anfärbung aller DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid (PI) detektiert werden. Der Farbstoff bindet spezifisch an Nukleinsäuren, so dass die Intensität der Fluoreszenz der Zelle ein Maß für ihren DNA-Gehalt darstellt.

Durch Permeabilisierung der Zellwand können DNA-Bruchstücke, die durch oben beschriebenen apoptosespezifischen Abbau der genomischen DNA entstanden sind, aus den Zellen herausgelangen, während sich die verbliebene höhermolekulare DNA im Zellkern anfärbt. Somit zeigen die apoptotischen Zellen in dieser Messmethode weniger Fluoreszenz-Intensität und enthalten damit weniger DNA (58, 120).

Diese Methode kann keinen definitiven Beweis der Apoptose erbringen, damit lässt sich aber ein Hinweis bzw. Anzeichen auf Apoptose erfassen. Der Prozentsatz an nekrotischen Zellen kann durch Ausschluss bzw. mangelnde Aufnahme des Farbstoffs „Trypan blue“ erkannt werden und sollte im Verhältnis zur Rate der apoptotischen Zellen vernachlässigbar gering sein.

### **2.4.6.2. Prinzip der durchflusszytometrischen Messung**

Das Durchflusszytometer beinhaltet ein optisches Meßsystem, das die für den Farbstoff Propidiumjodid charakteristische Fluoreszenz-Intensität für jede einzelne Zelle an einem bestimmten Messpunkt erfassen kann. Dafür müssen die zu untersuchenden Zellen fixiert und einzeln vorliegen (monodisperse Lösung ohne Zellaggregate), so dass alle Zellen den Meßpunkt einzeln – wie an einer Perlenschnur aufgereiht – passieren können.

An diesem Meßpunkt trifft monochromatisches, kohärentes Laserlicht einer bestimmten Wellenlänge im rechten Winkel auf die Zelle. Jede Zelle lenkt zum einen das Laserlicht ab, so dass Streulicht entsteht, zum anderen emittiert die Zelle auch ihrerseits Licht einer bestimmten für den eingesetzten Farbstoff charakteristischen Wellenlänge, das per Photodetektor gemessen werden kann (Fluoreszenz).

#### **2.4.6.3. Durchführung des Experiments**

Jeweils eine Kulturflasche mit wachstumsarretierten Mesangiumzellen wurde nach erneuter Gabe von 0,5-prozentigem Medium mit Interleukin-1, Wasserstoffperoxid oder mit einer Kombination beider Substanzen behandelt. Des Weiteren wurde eine Kulturflasche als Vergleichsansatz unstimuliert belassen. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde der Mediumüberstand der 4 Ansätze abpipettiert und für spätere TF-Aktivitätsmessungen aufbewahrt. Die adhärennten Zellen wurden zweimal mit warmem PBS ohne Ca/Mg gewaschen. Mit Hilfe von 1 zu 10 mit PBS ohne Ca/Mg verdünnter Trypsin/EDTA-Lösung wurden die Zellen vom Flaschenboden abgedaut und nach mehrmaligem Spülen mittels Resuspendieren in einer 10-ml-Pipette in ein 15-ml-Bluecap überführt. Nach Zugabe von kaltem 0,05%igem Natriumacid wurde die Suspension für 10 min bei 100 x g zentrifugiert (Waschschritt). Die Fixierung der Zellen erfolgte für 15 min mit 4%-igem Paraformaldehyd bei 4°C. Nach einem weiteren Waschschritt mit Natriumacid wurde das sedimentierte Zellpellet in 100 µl Saponin zur Permeabilisierung der Zellmembran zusammen mit 5 µl Propidiumjodidlösung resuspendiert. Auf eine 30-minütige Inkubation im Kühlschrank erfolgte ein weiterer Waschschritt mit Natriumacid. Die Mesangiumzellen wurden in 1 ml Natriumacid resuspendiert und zur durchflusszytometrischen Untersuchung in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Aus einer Probe wurden die Messwerte einer repräsentativen Stichprobe von jeweils 10000 Einzelzellen per Computer aufgezeichnet. Die FACS-Auswertungssoftware WinMDI (Version 2.8, Autor: Josef Trotter [<http://facs.scripps.edu>]) stellte diese dann in einer Zweiparameterdarstellung (engl. „dotplot“) graphisch dar. Hierbei wurde das Seitwärtsstreulicht als Maß für die unterschiedliche Größe einer Zelle gegen die für den Nukleinsäurefarbstoff Propidiumjodid charakteristische Fluoreszenz-Intensität aufgetragen. So ließen sich die vitale und die apoptotische Subpopulation optisch voneinander trennen. Durch

Zuweisung verschiedener Quadranten konnte ihr jeweiliger prozentualer Anteil an der Gesamtpopulation der Probe mit der Auswertungssoftware rechnerisch bestimmt und mit anderen Ansätzen verglichen werden. Zelltrümmer und Zellschrott wurden mittels der Thresholdfunktion direkt am FACS-Gerät ausgesondert und nicht mit aufgezeichnet.

Zur Identifikation der geringen Zahl an Zellaggregaten, die nicht in die Stichprobe der Einzelzellen einfließen sollten, wurde die Zweiparameterdarstellung „Seitwärtsstreuung gegen Engwinkelstreulicht“ verwendet. Die Zellaggregate lagen in dieser Ausstrahlung weiter oben rechts und konnten so in der FACS-Auswertungssoftware WinMDI von den zu untersuchenden Zellen abgesondert werden.

## **2.5. Statistische Methoden**

Die Aufarbeitung der Messdaten erfolgte mit Microsoft Excel. Als Lagemaß diente der Mittelwert und als Streuungsmaß die Standardabweichung. Die statistischen Tests für alle parametrischen Daten waren der Student's t-Test und die Varianzanalyse. Unterschiede und Fehlerwahrscheinlichkeiten (p-Werte) wurden auf einem Niveau von  $p < 0,05$  als signifikant und von  $p < 0,01$  als stark signifikant angesehen und gedeutet. Alle Experimente wurden mindestens 5 Mal durchgeführt.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1. Expression von Tissue-factor-mRNA in humanen Mesangiumzellen**

Da bereits Wiggins 1990 (139) beschrieben hat, dass proliferierende humane Mesangiumzellen (hMZ) eine erhöhte TF-assoziierte prokoagulatorische Aktivität (PCA) besitzen, während ruhende hMZ kaum noch PCA aufweisen, galt es zuerst abzuklären, ob die PCA direkt mit der Expression von TF-mRNA und damit der Denovo-Synthese von TF-Protein korreliert.

#### **3.1.1. Spezifisches Signal für TF-mRNA mittels RT-PCR**

Die Mesangiumzellen wurden auf ihre Expression von Gewebsthromboplastin, englisch Tissue factor oder abgekürzt TF, untersucht. Es ließ sich feststellen, dass sie grundsätzlich TF-mRNA exprimieren, die mit dem von mir eingesetzten RT-PCR-Verfahren spezifisch nachweisbar ist. In Abb. 3.1 wurde exemplarisch der Ausschnitt eines Agarosegels aus einer Versuchsreihe ( $n > 5$ ) abgelichtet. Auf dem mit Ethidiumbromid gefärbten Gel zeigt sich, dass unter Verwendung von zwei speziell hergestellten Primern, die zu Teilbereichen der Basensequenz der TF-mRNA komplementär sind, genau eine einzelne spezifische Bande zur Darstellung kommt. Die darin enthaltene cDNA, die in der PCR amplifiziert wurde und zur TF-mRNA komplementäre Teilstücke darstellt, hat eine theoretisch errechnete Länge von 726 Basenpaaren; ihre Bande im Elektrophoresegel liegt erwartungsgemäß auf der Höhe zwischen der 3. und 4. Bande des in einer separaten Gelkammer mitgelaufenen Standardmarkers ( $\Phi$ X174 Hae III Digest), was einem Bereich zwischen 603 (3. Peak) und 872 Basenpaaren (4. Peak) entspricht (30). Da keine weiteren Nebenprodukte bzw. Nebenbanden in der Gelelektrophorese detektiert wurden, spricht die eine Bande für eine spezifische Amplifikation des TF-Teilstücks. Somit wurde auch von einer Sequenzierung des aufgetrennten Materials abgesehen.

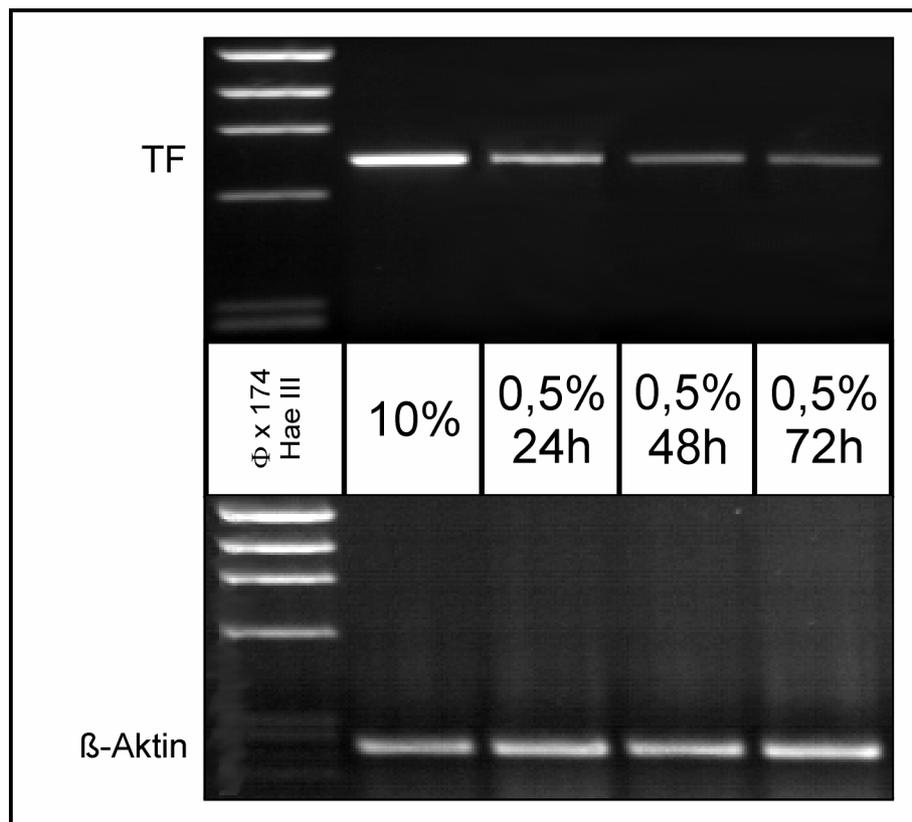


Abb. 3.1: Expression von TF-mRNA in proliferierenden MZ bei einem FCS-Gehalt im Medium von 10% (2. Bande von links) und Expression von TF-mRNA in durch Serumdeprivation wachstumsarretierten hMZ, die mit einem FCS-Gehalt von 0,5% im Medium kultiviert wurden über einen Zeitraum von 24 h, 48 h und 72 h (Banden 3-5 von links). Proliferierende MZ exprimieren TF-mRNA, während eine deutliche Suppression ab 48 h Serumentzug auftritt.

### 3.1.2. Humane Mesangiumzellen in Proliferation

Die anhand der entsprechenden Bande zur Darstellung kommende Expression von TF-mRNA ist bei der Kultivierung der hMZ mit einem hohen FCS-Gehalt von 10% im Medium am deutlichsten ausgeprägt (siehe Abb. 3.1, 2. Bande), wenn man diese proliferierende hMZ-Population mit dem TF-mRNA-Level in lysierten Zellen vergleicht, deren Wachstum durch Entzug des Serums (FCS) für 24, 48 oder 72 Stunden arretiert wurde.

### 3.1.3. Nachweis der gleichmäßig vorhandenen RNA-Menge mittels Konzentrationsmessung und Vergleich der β-Aktin-Banden

Da für jede Probe jeweils genau die Zellmenge aus einer 50-ml-Kulturflasche eingesetzt wird, ist gewährleistet, dass auch die nahezu gleiche von mRNA zu cDNA

umgeschriebene Menge an Material mittels PCR amplifiziert wird. So lässt die jeweilige Intensität einer spezifischen Bande im Agarosegel eine semi-quantitative Aussage über die ursprünglich vorhandene Menge an mRNA sowohl für TF als auch für  $\beta$ -Aktin zu. Die gleichmäßig vorhandene Menge an mRNA nach Aufreinigung und Präparation des Zelllysats wurde mittels Messung der RNA-Konzentration verifiziert; bei geringen Abweichungen wurde gegebenenfalls die Menge angepasst und damit normiert.

$\beta$ -Aktin ist ein ubiquitär vorkommendes Strukturprotein, dessen mRNA-Level weder einer entscheidenden Abhängigkeit vom Proliferationsverhalten der Zelle noch einer stärkeren Regulation durch Zytokine unterliegt. Wie in Abb. 3.1 ersichtlich, weisen die  $\beta$ -Aktin-Banden in allen Proben eine gleichmäßige Signalintensität auf, womit sich der Nachweis führen lässt, dass das unterschiedliche TF-Signal tatsächlich durch eine in der jeweiligen Zellpopulation unterschiedliche TF-mRNA-Expression bedingt ist – und nicht etwa durch Konzentrationsunterschiede in der Gesamtmenge an RNA aufgrund unterschiedlicher Zelldichte und damit unterschiedlicher Zellmenge oder Divergenzen bei der Aufreinigung der RNA mit Schwankungen der letztendlich aus der Präparationssäule extrahierten RNA-Menge.

#### **3.1.4. Wachstumsarretierung**

Um eine zuverlässige Wachstumsarretierung zu erreichen, wurde bei früheren Fragestellungen und Untersuchungen an hMZ ein Serumentzug durchgeführt, bei dem der FCS-Gehalt im Medium für 72 h auf 0,5% herabgesetzt wurde (120). Die Arretierung des Wachstums lässt sich unter dem Mikroskop anhand der nicht weiter zunehmenden Zelldichte beobachten. Nach Suppression des Wachstums der Mesangiumzellen in Kultur durch Herabsetzen des FCS-Gehalts im Medium fällt der unter Proliferationsbedingungen sehr hohe Level an TF-mRNA-Expression zeitabhängig ab; nach 24 h Serumdeprivation ist die TF-Expression einigermaßen, nach 48 h hingegen deutlich supprimiert. Das heißt, es wird ein basaler Wert nach ca. 48 h erreicht, der dann auch nach 72 h Serumentzug fortbesteht. In Analogie zum starken Anstieg der TF-mRNA-Produktion unter Proliferationsbedingungen ohne weitere Stimulation geht die Abnahme der TF-Expression bis hin zu einem nach genügend

langer Zeit nur noch sehr geringen Level mit der Verlangsamung und der nachfolgend kompletten Arretierung des Wachstums der hMZ einher.

Dieser Zusammenhang, dass nämlich ruhende Mesangiumzellen basal nur geringe Mengen an TF produzierten, ist die Grundvoraussetzung, um in Experimenten mit dem Einsatz von proinflammatorischen Stimuli weitere Aussagen zu treffen, inwiefern diese Einfluss auf den TF-mRNA-Level in Mesangiumzellen nehmen. Deshalb wurde in weiteren Experimenten vor Stimulation standardisiert eine Wachstumsarretierung mit einer Serumdeprivation (nur 0,5% FCS) für 3 Tage (= 72 h) durchgeführt.

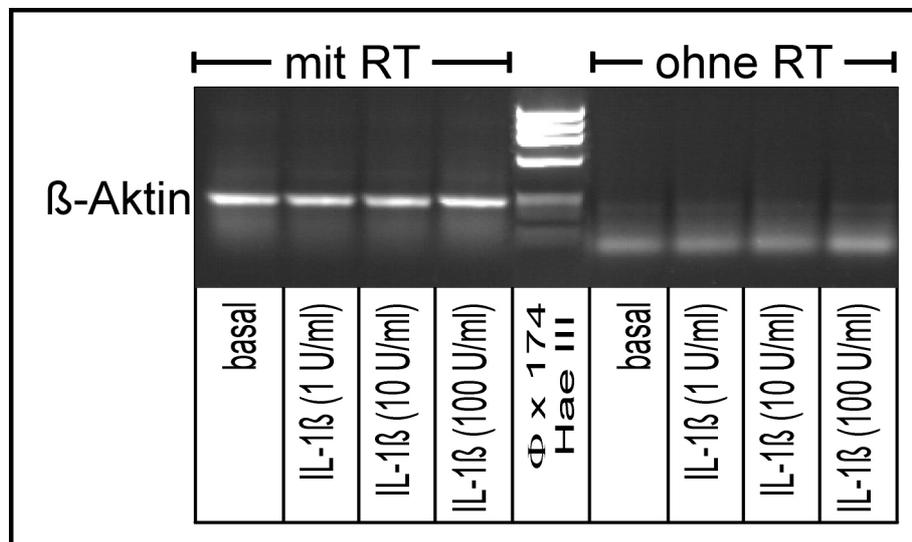


Abb. 3.2: Exemplarische Darstellung der gelungenen  $\beta$ -Aktin-Normierung (links) und Nachweis des vollständigen DNA-Verdaus anhand der fehlenden spezifischen  $\beta$ -Aktin-Banden, hier in einem Versuch zur Untersuchung der dosisabhängigen Stimulation von MZ mit IL-1 $\beta$  über 12 h.

### 3.1.5. Nachweis der vollständigen Verdauung der genomischen DNA

Durch den Einsatz von RNA-Präparationssäulen aus dem Rneasy-Mini-Kit der Firma Quiagen, die spezifisch RNA binden, während andere Zellbestandteile und vor allem DNA mit den Spüllösungen ausgewaschen werden, soll in Kombination mit einem zusätzlich durchgeführten DNA-Verdau hinreichend sichergestellt werden, dass sich keine genomische DNA mehr in der nach Präparation gewonnenen RNA-Probe befindet. Die unbeabsichtigte Amplifikation von genomischer DNA zusammen mit der aus mRNA umgeschriebenen cDNA würde die Aussagemöglichkeiten der semi-

quantitativen PCR gerade bei Proben mit niedrigen Signalintensitäten stark einschränken. Das gewonnene Signal nach Auftrennung im Agarosegel wäre dann nicht spezifisch für die mRNA und ließe keine Rückschlüsse mehr auf ihre intrazellulär vorhandene Menge im Vergleich zur  $\beta$ -Aktin-Expression zu.

Abb. 3.2 zeigt exemplarisch den erfolgreich durchgeführten Test auf vollständiges Fehlen der genomischen DNA, der bei allen Versuchen Grundvoraussetzung für die weitere Verwendung der Proben war. Hierzu wurde neben dem regulären Umschreiben von mRNA zu cDNA und nachfolgendem Amplifizieren der  $\beta$ -Aktin-cDNA mit den entsprechenden Primern in einem zweiten Ansatz durch Weglassen des Enzyms „Reverse Transkriptase“ der Umschreibevorgang verhindert, so dass sich nur in diesem Ansatz – wenn überhaupt – genomische DNA befinden konnte. Alle Proben wurden exakt identisch behandelt, außer dass bei den Proben rechts vom Standard-Marker („ohne RT“) statt der reversen Transkriptase die entsprechende Menge Wasser zugesetzt wurde. Ein spezifisches Signal, das hier aufgetreten wäre, würde einen nicht vollständigen Verdau und das Vorhandensein von genomischer DNA in der aus der Präparationssäule eluierten Lösung belegen. Die  $\beta$ -Aktin-Sequenzanteile der genomischen DNA müssten nach Amplifizierung mittels PCR als Banden in der Gelelektrophorese erscheinen. Es zeigen sich in Abb. 3.2 jedoch rechts („ohne RT“) keine für das  $\beta$ -Aktin-Signal spezifischen Banden, die auf gleicher Höhe wie links auf dem Gel liegen müssten, wo Reverse Transkriptase verwendet wurde („mit RT“) und damit regulär die mRNA in cDNA umgeschrieben und nachfolgend durch die PCR vervielfältigt wurde.

Das lediglich am unteren Rand des Gels vorhandene sehr schwache und unspezifisch breite Signal, das aus kleinsten DNA-Bruchstücken besteht, kommt durch noch vorhandene Random-Primer zustande, die wegen fehlender Reaktionsprodukte – es war keine DNA enthalten – in diesen Proben nicht verbraucht werden konnten.

Im Vergleich zum fehlenden Signal der Proben ohne RT (rechts) mit dem Nachweis, dass genomische DNA nicht in das PCR-Signal einstreut und damit die Aussage nicht verfälscht wird, ist in allen Proben mit RT-Zusatz (links) und damit stattgefunderer reverser Transkription ein vom optischen Eindruck her annähernd gleichmäßiges

$\beta$ -Aktin-Signal nachweisbar, so dass damit semiquantitative Aussagen in Bezug auf die zu untersuchenden Regulationsvorgänge der mRNA für Gewebsthromboplastin möglich sind, da eine Normierung anhand der  $\beta$ -Aktin-Signal-Relationen stattfinden kann.

### **3.1.6. Unabhängigkeit des $\beta$ -Aktin-Signals von der Stimulation der Zellen mit IL-1 $\beta$**

In dieser Versuchsreihe, die wie alle weiteren mindesten fünfmal unabhängig voneinander durchgeführt wurde, zeigt sich weiterhin, dass auf dem exemplarisch abgebildeten Gel das  $\beta$ -Aktin-Signal als Relations- und Normierungsfaktor der PCR von der Dosis des Stimulans IL-1 $\beta$  unabhängig ist. Trotz in den Proben unterschiedlich eingesetzter Menge an IL-1 $\beta$  in einem Variationsbereich von 0 bis 100 U/ml bleibt das PCR-Signal für  $\beta$ -Aktin in dem Gel annähernd konstant.

In den Abb. 3.1 bis 3.3 liegen die spezifischen Banden der in der PCR exponentiell vervielfachten  $\beta$ -Aktin-Teilstücke auf der Höhe zwischen 7. und 8. Bande des Standard-Markers  $\Phi$ X174 Hae III, was die Gesamtsumme der Basenpaare des amplifizierten DNA-Strangs auf 271 (7. Bande) bis 234 (8. Bande) einschränkt (30). Hier liegt die Bande somit in ihrem erwarteten Bereich, da für die amplifizierten  $\beta$ -Aktin-Teilstücke eine theoretische Länge von 248 Basenpaaren berechnet wurde.

## **3.2. Stimulation von hMZ und tMZ**

### **3.2.1. Einfluss von Zytokinen auf die TF-mRNA-Expression bei hMZ**

Wie aus Abb. 3.3 ersichtlich wird, ist die basal sehr niedrige intrazellulär vorhandene Konzentration an TF-mRNA in humanen Mesangiumzellen durch GNSO und Zytokine wie PDGF, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  stimulierbar. Während GNSO als NO-Donator (1 mM) und PDGF (50 ng/ml), ein wohlbekanntes Proliferationsstimulans für Mesangiumzellen, einen mäßigen Anstieg der TF-Expression bewirken, liegt eine starke Antwort bei der Stimulation durch TNF- $\alpha$  (100 ng/ml) und IL-1 $\beta$  (10 U/ml) vor (12 h Inkubation). Bei weiteren Versuchsreihen wurde der Fokus vor allem auf das Zytokin IL-1 $\beta$  als Hauptstimulans gelegt; hiermit ist – wie später mehrfach noch dargestellt – in

geeigneter Weise die basal niedrig bestehende TF-mRNA-Expression der wachstums-arretierten humanen Mesangiumzellen signifikant steigerbar.

In Bezug auf das  $\beta$ -Aktin-Signal lässt sich feststellen, dass keines der verwendeten Zytokine bei Einsatz von identischen Mengen an Zellmaterial und an RNA zur Amplifizierung mittels RT-PCR zu einer signifikant gesteigerten Expression von  $\beta$ -Aktin-mRNA führt. Das Strukturprotein  $\beta$ -Aktin erweist sich als unabhängig von der Stimulation der humanen Mesangiumzellen durch Zytokine.

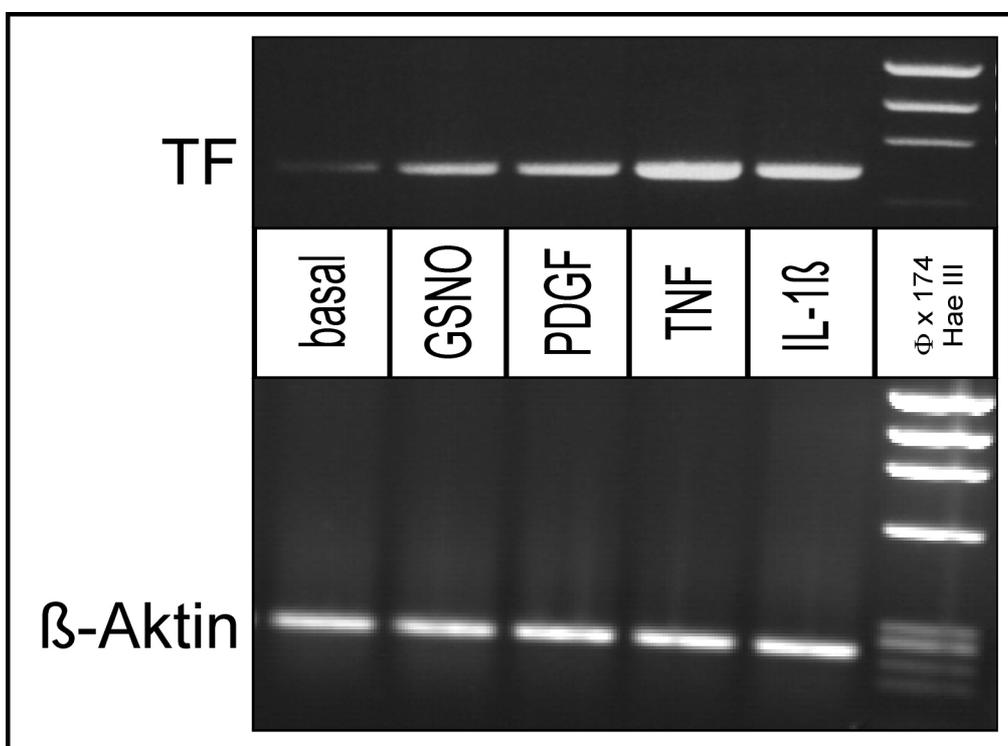


Abb. 3.3: Gelelektrophorese einer RT-PCR: Vergleich der Effekte auf die TF-mRNA-Expression in hMZ durch unterschiedliche proinflammatorische Stimuli. Die  $\beta$ -Aktin-mRNA-Expression bleibt unbeeinflusst, während bei TF Regulationsvorgänge anhand der unterschiedlichen Expression bzw. Signalintensitäten im Gel sichtbar werden.

### 3.2.2. Einfluss von Zytokinen auf die TF-mRNA-Expression bei tMZ

Die Stimulationsergebnisse mehrerer Einzelversuche an der immortalisierten Mesangiumzelllinie (transfizierte MZ) sind in Diagrammform als Abb. 3.4 zusammengefasst. Zusätzlich ist im unteren Teil ein Ausschnitt aus einem Elektrophoresegel

abgebildet, um die Diagramm-Daten exemplarisch auch vom rein optischen Eindruck her nachvollziehbar zu gestalten.

Für die Stimulierbarkeit durch Entzündungsmediatoren wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  zeigt sich, dass auch bei den transfizierten Zellen (tMZ) IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  erwartungsgemäß zu einer signifikanten Erhöhung des intrazellulären TF-Levels führen. Die basale TF-mRNA-Expression ruhender tMZ beträgt  $32\pm 11$  relative Einheiten (nachfolgend abgekürzt als rel. Einh.). Diese wird durch Stimulation mit IL-1 $\beta$  (25 U/ml) signifikant auf  $87\pm 6$  rel. Einh. gesteigert (2,7facher Ausgangswert); ähnlich verhält sich TNF- $\alpha$  (100 ng/ml), das einen Anstieg des TF-mRNA-Levels auf  $96\pm 14$  rel. Einh. bewirken konnte (dreifacher Ausgangswert). Insofern besteht eine Analogie im Verhalten der transfizierten Mesangiumzellen aus der immortalisierten Zelllinie (tMZ) und der nicht-transfizierten Mesangiumzellen, die aus menschlichem Nierengewebe (nach Tumornephrektomie) frisch isoliert und kultiviert wurden (hMZ).

Als von gramnegativen Bakterien gebildetes Endotoxin vermag es LPS (10  $\mu$ g/ml) ebenso, die intrazellulär vorhandene mRNA für TF signifikant zu steigern. Mit dem Anstieg auf  $79\pm 13$  rel. Einh. wird hier das beinahe 2,5fache des Ausgangswertes erreicht.

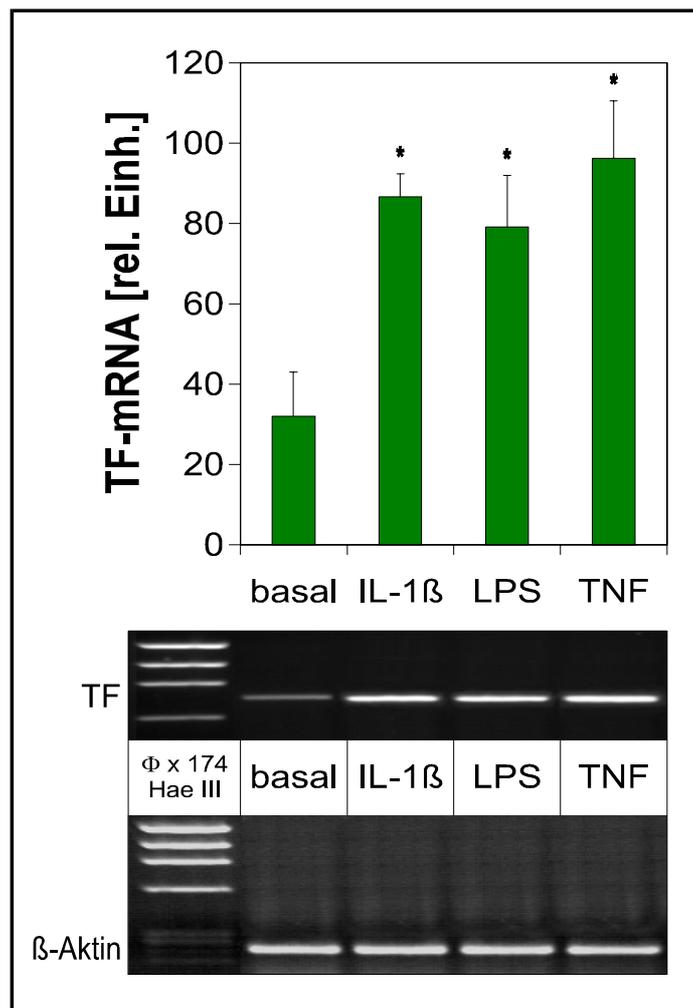


Abb. 3.4: Bei tMZ wurden mittels semi-quantitiver RT-PCR und Normierung durch  $\beta$ -Aktin die Effekte auf die TF-mRNA-Expression untersucht, die von den proinflammatorischen Stimuli IL-1 $\beta$  (25 U/ml), LPS (10 $\mu$ g/ml) und TNF- $\alpha$  (100 ng/ml) induziert werden. Diagramm mit Durchschnittswerten und Standardabweichung für TF oben und exemplarische Gelelektrophorese unten (\* $p$ <0,05).

### 3.2.3. Direkter Vergleich zwischen transfizierten und nicht-transfizierten

#### Mesangiumzellen

In der Tabelle 3.1 sind Durchschnittswerte mit Standardabweichung für die Untersuchungen in Bezug auf die Induktion des Tissue Factor in Mesangiumzellen aufgeführt; sie verdeutlichen das identische Verhalten zwischen den durch Transfektion immortalisierten MZ (tMZ) einerseits und den nicht-transfizierten MZ (hMZ) andererseits. Der Vergleich geschieht hier anhand der Angaben für unbehandelte, allein durch Serumentzug (0,5% FCS-Gehalt im Medium) über 3 Tage im Wachstum arretrierte MZ und für zusätzlich mit IL-1 $\beta$  und LPS stimulierte Zellpopulationen. Er

bezieht sich sowohl auf die durch semiquantitative PCR-Methoden ermittelte Expression von TF-mRNA nach 12 h als auch auf die übergeordneten Ebenen der intrazellulären TF-Proteinkonzentration (nach 16 h) und der TF-Aktivität (bei einer Gesamtproteinkonzentration von 0,5 mg/ml und 16 h Inkubationszeit).

	nicht-transfizierte <u>humane</u> <u>Mesangiumzellen (hMZ)</u>			transfizierte <u>Mesangiumzellen</u> <u>(tMZ)</u>		
	basal	<b>IL-1<math>\beta</math></b> (25 U/ml)	<b>LPS</b> (10 $\mu$ g/ml)	basal	<b>IL-1<math>\beta</math></b> (25 U/ml)	<b>LPS</b> (10 $\mu$ g/ml)
<b>TF-mRNA</b> (12 h) [rel. Einh.]	27 ( $\pm$ 6)	84 ( $\pm$ 10)	90 ( $\pm$ 11)	32 ( $\pm$ 7)	84 ( $\pm$ 15)	79 ( $\pm$ 13)
<b>TF-Protein</b> (16 h) [ng/mg Protein]	27,1 ( $\pm$ 4,3)	37,8 ( $\pm$ 4,8)	44,3 ( $\pm$ 3,3)	22,7 ( $\pm$ 2,6)	39,0 ( $\pm$ 3,1)	37,4 ( $\pm$ 3,4)
<b>TF-Aktivität</b> (16 h) [pM]	1510 ( $\pm$ 134)	7809 ( $\pm$ 423)	8401 ( $\pm$ 1129)	1483 ( $\pm$ 270)	8562 ( $\pm$ 768)	6071 ( $\pm$ 930)

Tab. 3.1: Vergleich zwischen nicht-transfizierten (Datenspalten 1–3) und transfizierten Mesangiumzellen (Datenspalten 4–6). Die eingeklammerten Zeitangaben beziehen sich auf die Inkubationszeit. TF-Protein ist bezogen auf den Gesamtproteingehalt des Zelllysats. Der Ausgangswert (basal) bezieht sich auf eine ruhende, unstimulierte Population, die durch Herabsetzen des Serumgehalts im Medium auf 0,5% FCS über 72 h im Wachstum arretiert und synchronisiert wurde.

Auf allen Ebenen zeigt sich eine signifikante TF-Stimulation der ruhenden hMZ und auch der tMZ sowohl durch IL-1 $\beta$  wie auch durch LPS; die ermittelten Durchschnittswerte sind im Vergleich der beiden Populationen zueinander ähnlich und weisen keine signifikanten Unterschiede auf. Es ergibt sich für IL-1 $\beta$  (25 U/ml) nicht nur – wie zuvor beschrieben – eine Erhöhung auf RNA-Ebene von basal 27 $\pm$ 6 rel. Einh. auf 84 $\pm$ 10 bei hMZ bzw. von 32 $\pm$ 7 rel. Einh. auf 84 $\pm$ 15 bei tMZ, sondern TF ist bei beiden Zellpopulationen nahezu identisch auch auf Protein-Ebene und in der biologisch relevanten Aktivität durch IL-1 $\beta$  stimulierbar. Beim TF-Protein wird ein basaler Wert von 27,1 $\pm$ 4,3 ng/mg Gesamtprotein (hMZ) bzw. 22,7 $\pm$ 2,6 ng/mg (tMZ) auf 37,8 $\pm$ 4,8 (hMZ) bzw. 39,0 $\pm$ 3,1 (tMZ) gesteigert, was eine Zunahme um das 1,4- bis 1,7fache bedeutet. Bei der Aktivität ist eine Steigerung auf das 5–6fache festzustellen von basal 1510 $\pm$ 134 auf 7809 $\pm$ 423 pM bei hMZ bzw. 1483 $\pm$ 270 auf 8562 $\pm$ 768 pM bei tMZ.

Für LPS (10 µg/ml) liegt bei der TF-mRNA-Expression ein Anstieg von  $27 \pm 6$  auf  $90 \pm 11$  rel. Einh. (hMZ) bzw. von  $32 \pm 7$  auf  $79 \pm 13$  rel. Einh. (tMZ) vor; TF-Protein erhöht sich bei beiden Zellpopulationen in ähnlichem Maße von  $27,1 \pm 4,3$  auf  $44,3 \pm 3,3$  (hMZ) bzw. von  $22,7 \pm 2,6$  auf  $37,4 \pm 3,4$  ng/mg Gesamtprotein (tMZ). Die TF-Aktivität in den Zelllysaten beläuft sich bei Stimulation mit LPS auf  $8401 \pm 1129$  pM bei hMZ und  $6071 \pm 930$  pM bei tMZ. Die Aktivitätssteigerung durch LPS beträgt damit ebenfalls das 4–6fache.

### 3.3. Zeit- und Dosisabhängigkeit der TF-Induktion durch IL-1 $\beta$

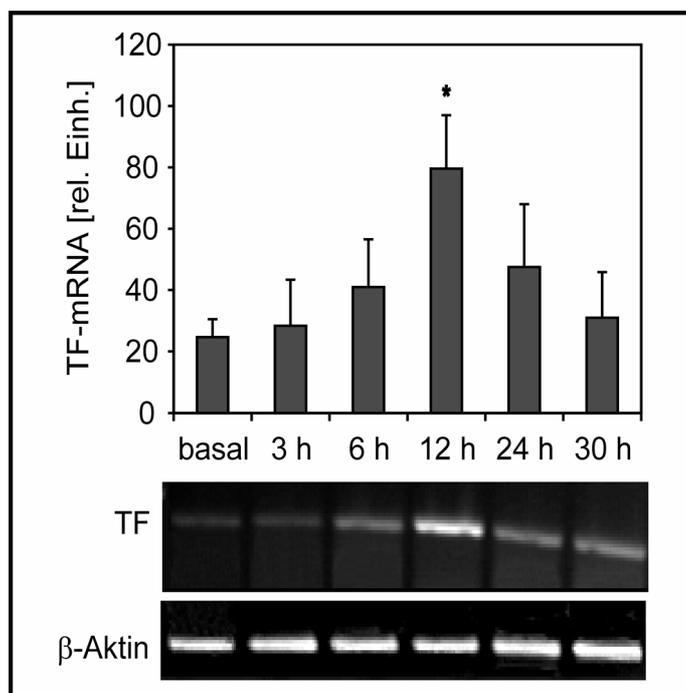


Abb. 3.5: Zeitabhängigkeit der durch IL-1 $\beta$  (25 U/ml) induzierten Expression von TF-mRNA in MZ, welche durch Reduktion der Serumkonzentration (0,5% FCS für 72 h) im Kulturmedium in ihrem Wachstum limitiert und synchronisiert worden sind. Die TF-mRNA-Expression wurde ermittelt durch semiquantitative RT-PCR in Gegenüberstellung zu  $\beta$ -Aktin als Normierung (\* $p < 0,05$ ).

#### 3.3.1. Zeitabhängige Induktion der TF-mRNA-Expression durch IL-1 $\beta$

Wie Abb. 3.5 verdeutlicht, wurde die Expression der TF-mRNA zeitabhängig induziert. Mittels semiquantitativer RT-PCR in Bezug auf  $\beta$ -Aktin zum Vergleich lässt sich

zeigen, dass IL-1 $\beta$  in einer Konzentration von 25 U/ml die TF-mRNA signifikant zu erhöhen vormag, ein Maximum der Expression wird nach 12 Stunden (80 $\pm$ 17 rel. Einh.) erreicht. Nach 30 Stunden ist mit einem Wert von 31 $\pm$ 15 rel. Einh. der Ausgangswert (25 $\pm$ 6 rel. Einh.) fast wieder hergestellt.

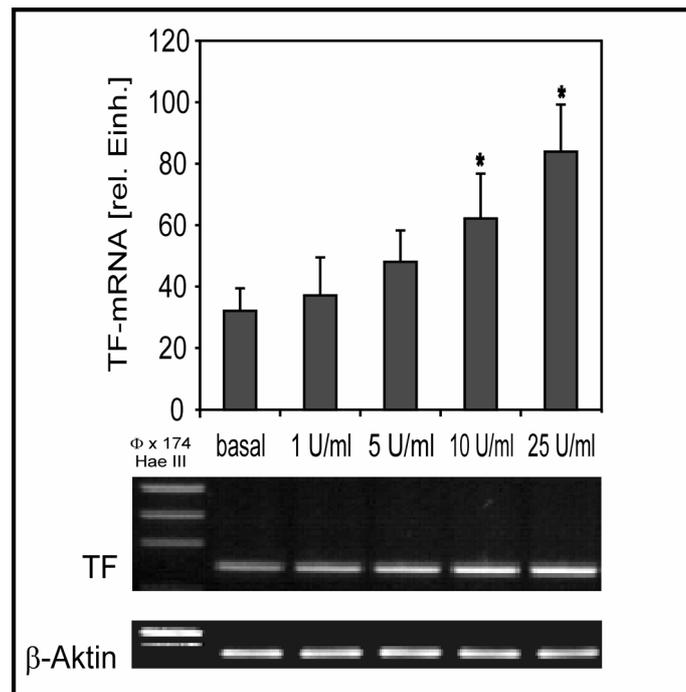


Abb. 3.6: Dosisabhängige Expression von TF-mRNA in MZ bei Stimulation durch IL-1 $\beta$ . Angabe der jeweiligen Konzentration auf der X-Achse (12 h Inkubation). Die TF-mRNA-Expression wurde durch semiquantitative RT-PCR in Gegenüberstellung mit  $\beta$ -Aktin ermittelt (exemplarische Gelelektrophorese im unteren Teil der Abb.). Im Diagramm (oberer Teil der Abb.) sind die Durchschnittswerte aus n>5 Versuchen mit Standardabweichung für TF aufgetragen (\*p<0,05).

### 3.3.2. Dosisabhängige Induktion der TF-Expression und TF-Aktivität durch IL-1 $\beta$

Bei der Untersuchung der Dosisabhängigkeit auf RNA-Ebene induzierte IL-1 $\beta$  in einer Konzentration von 25 U/ml nach 12 h Inkubation die stärkste TF-Antwort in Höhe von 83 $\pm$ 15 rel. Einh. (Abb. 3.6). Bereits ab 10 U/ml lag ein signifikanter Anstieg vor (70 $\pm$ 14 rel. Einh. im Vergleich zu dem Ausgangswert von 34 $\pm$ 7 rel. Einh.).

Die TF-Protein-Konzentration, die durch ELISA ermittelt wurde (siehe Kapitel 2.4.4.), war signifikant erhöht nach 16-stündiger Inkubation ab 10 U/ml IL-1 $\beta$  (30,8 $\pm$ 3,7ng/mg

Gesamtprotein) und auch bei 25 U/ml IL-1 $\beta$  ( $39,0\pm 3,1$  ng/mg Gesamtprotein), wie auf Abb. 3.7 dargestellt.

Eine relevante Hochregulation der TF-Aktivität (Abb. 3.8) in den lysierten Zellen wurde bereits für 5 U/ml IL-1 $\beta$  gefunden ( $4480\pm 491$  pM) bei jeweils 16-stündiger Inkubation bis zur Messung. Höhere Konzentrationen bewirkten einen weiteren Anstieg bis auf  $8451\pm 762$  pM bei 25 U/ml, was mehr als einer Versechsfachung des Ausgangswertes von  $1316\pm 275$  pM entspricht.

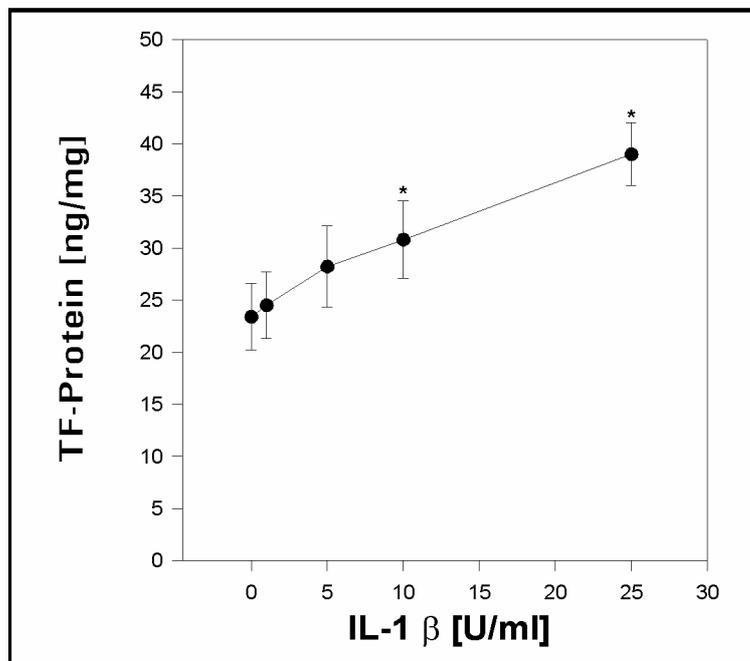


Abb. 3.7: TF-Protein-Expression in Zelllysaten (ELISA). X-Achse: IL-1 $\beta$ -Stimulation über 16 h mit angegebenen Konzentrationen in U/ml. Y-Achse: TF-Proteinmenge bezogen auf Gesamtproteingehalt im Zelllysate in ng/mg (\* $p < 0,05$ ).

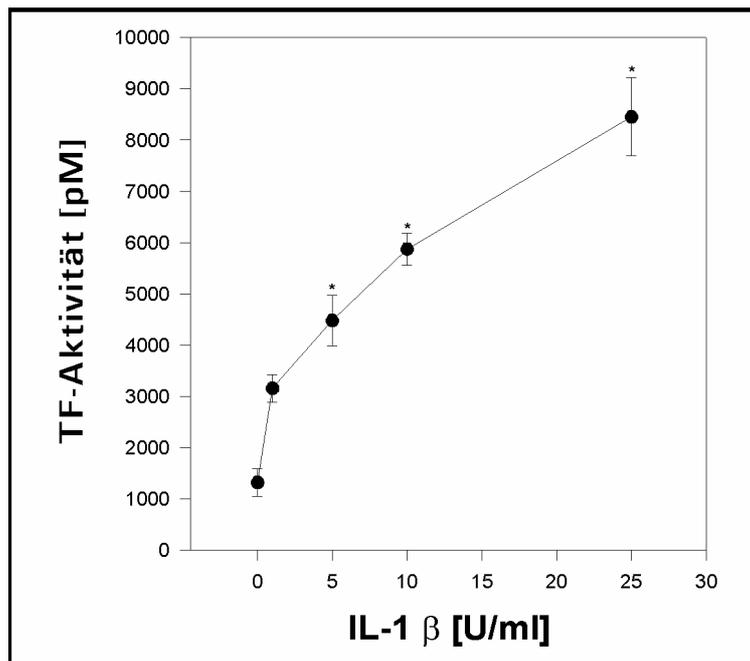


Abb. 3.8: TF-Aktivität in lysierten Mesangiumzellen. Bestimmung durch FVII-Bindungstest mit Farbumschlagsreaktion. X-Achse: IL-1 $\beta$ -Stimulation über 16 h mit angegebenen Konzentrationen in U/ml. Y-Achse: TF-Aktivität bei einem Gesamtproteingehalt im Zelllysät von 0,5 mg/ml (\* $p < 0,05$ ).

### 3.4. PKC-abhängige TF-Stimulation

#### 3.4.1. Blockierung der PKC durch Calphostin C

Abb. 3.9 und Abb. 3.10 zeigen, dass Calphostin C, ein selektiver PKC-Inhibitor, in der Lage ist, in der eingesetzten Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  die Induktion von TF vollständig zu blockieren, ohne dabei einen signifikanten Einfluss auf die ruhende, unstimulierte Zellpopulation auszuüben.

So liegt bei alleiniger Inkubation der Mesangialzellkultur mit Calphostin C der TF-mRNA-Level mit  $29 \pm 10$  rel. Einh. sehr nahe beim Ausgangswert von  $32 \pm 11$  rel. Einh.; für die Koinkubation mit Calphostin C (1  $\mu\text{M}$ ) zusammen mit IL-1 $\beta$  (25 U/ml) ergeben sich  $26 \pm 8$  rel. Einh. Im ELISA wurden Werte von  $15,7 \pm 1,7$  ng/mg Gesamtprotein für Calphostin C allein und  $15,0 \pm 2,0$  ng/mg für die Koinkubation mit Calphostin C und IL-1 $\beta$  gefunden, bei einem Ausgangswert von  $32,0 \pm 10,9$  ng/mg, wobei die hierbei bestehende zusätzliche Erniedrigung des TF-Proteins durch Calphostin C (in Bezug auf den basalen Wert) nicht als signifikant angesehen werden kann. Somit liegt

nahe, dass die Hochregulation von TF durch IL-1 $\beta$  über einen Proteinkinase-C-abhängigen Weg verläuft, wenn durch Inhibition der PKC die Stimulation der MZ durch IL-1 $\beta$  blockierbar ist.

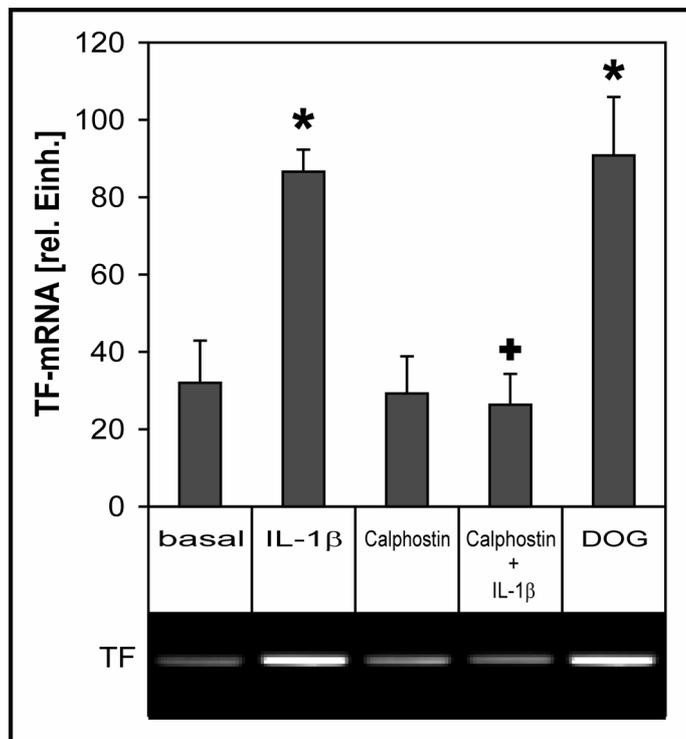


Abb. 3.9: Die Blockierung der Proteinkinase C durch Calphostin C reduziert die durch IL-1 $\beta$  induzierte TF-mRNA-Expression soweit, dass der Ausgangswert wieder erreicht wird. Die TF-Antwort wird vollständig und signifikant verhindert (+ $p < 0,05$  im Vergleich zur IL-1 $\beta$ -Stimulation). Die direkte Stimulation der PKC durch DOG induziert TF in gleicher signifikanter Weise, wie das bei IL-1 $\beta$  der Fall ist (\* $p < 0,05$  im Vergleich zum basalen Signal).

### 3.4.2. Direkte Aktivierung der PKC durch DOG

Ein zellwandpermeabler Aktivator der Proteinkinase C (abgekürzt PKC) wurde für weitere Untersuchungen eingesetzt (32): Die Substanz 1,2-dioctanoyl-sn-glycerol (abgekürzt DOG) kann von sich aus TF genauso induzieren wie das parallel bei IL-1 $\beta$  der Fall ist. Auf RNA-Ebene vermag DOG die TF-Expression von basal  $32 \pm 11$  rel. Einh. auf  $91 \pm 15$  rel. Einh. signifikant zu steigern, IL-1 $\beta$  bewirkt eine Steigerung auf  $87 \pm 6$  rel. Einh. (Abb. 3.9). Der TF-Proteingehalt wird durch DOG von basal  $24,5 \pm 1,3$  ng/mg auf  $35,5 \pm 2,3$  ng/mg Gesamtprotein erhöht, bei IL-1 $\beta$  sind es  $38,1 \pm 2,1$  ng/mg (Abb. 3.10).

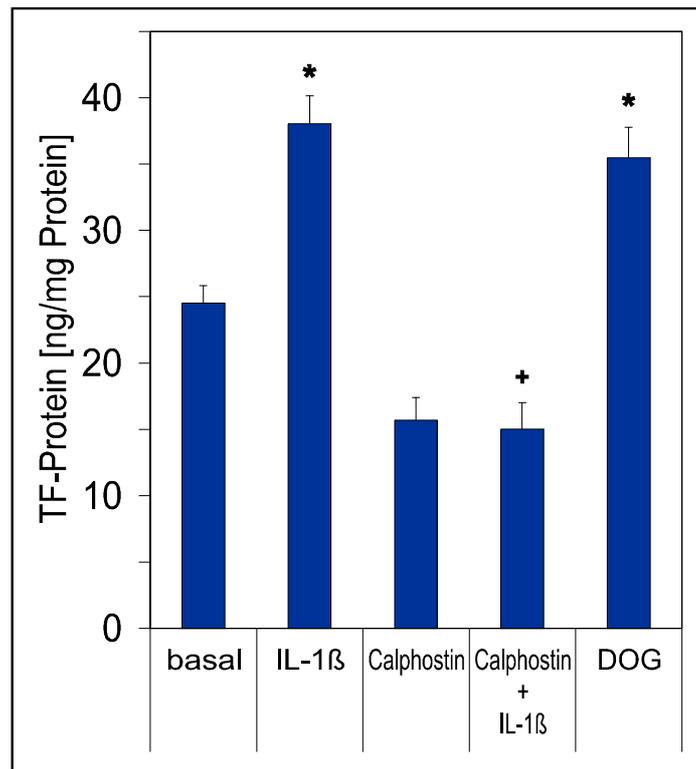


Abb. 3.10: Die Blockierung der Proteinkinase C durch Calphostin C reduziert die durch IL-1 $\beta$  induzierte Erhöhung des intrazellulären TF-Proteingehalts in dem Maße, dass sogar der Ausgangswert unterschritten wird. Diese Unterschreitung ist allerdings im Vergleich zum Ausgangswert nicht signifikant, während die Reduktion der TF-Antwort auf IL-1 $\beta$  als signifikant (+ $p < 0,05$  im Vergleich zur IL-1 $\beta$ -Stimulation) zu bezeichnen ist und einen Hinweis auf einen PKC-abhängigen Signalweg der durch IL-1 $\beta$  bedingten TF-Stimulation gibt. Die direkte Stimulation der PKC durch DOG induziert TF in gleicher signifikanter Weise, wie das bei IL-1 $\beta$  der Fall ist (\* $p < 0,05$  im Vergleich zum Ausgangswert bei ruhenden, unstimulierten Zellen).

### 3.5. Ca<sup>2+</sup>-abhängige TF-Stimulation

#### 3.5.1. Reduktion der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration durch BAPTA/AM

Durch die 30-minütige Vorinkubation mit dem intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Chelator BAPTA/AM (10  $\mu$ M) wurde die Induktion des TF durch IL-1 $\beta$  signifikant gesenkt.

Es ergaben sich  $38 \pm 8$  rel. Einh. für die RT-PCR und  $21,5 \pm 1,3$  ng/mg Gesamtprotein im ELISA, d. h., die durch IL-1 $\beta$  bewirkte Erhöhung des TF von  $32 \pm 11$  auf  $87 \pm 6$  rel. Einh. (RNA-Ebene) bzw. von  $24,5 \pm 1,3$  auf  $38,1 \pm 2,1$  ng/mg (Proteinebene) wurde durch Senkung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration vollständig verhindert (siehe Abb. 3.11

und 3.12). BAPTA/AM allein konnte hingegen die basale Expression nicht beeinflussen ( $31 \pm 10$  rel. Einh.,  $20,4 \pm 2,0$  ng/mg Gesamtprotein).

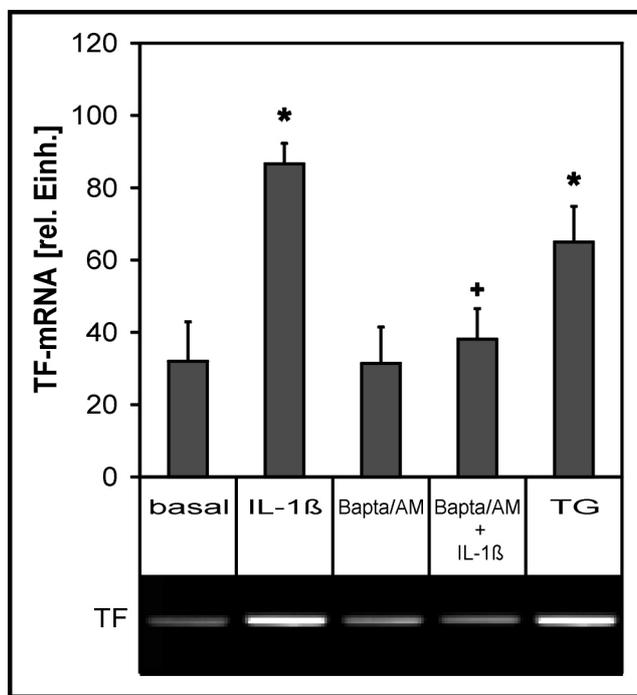


Abb. 3.11: Effekte von BAPTA/AM und Thapsigargin auf mRNA-Ebene, exemplarische Gelelektrophorese einer semiquantitativen RT-PCR und zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse aller Versuche in Diagrammform. TG steigert genauso wie IL-1 $\beta$  signifikant die TF-mRNA-Expression (\* $p < 0,05$ ), die Koinkubation mit BAPTA/AM und IL-1 $\beta$  blockiert den IL-1 $\beta$ -abhängigen Stimulations-effekt (+ $p < 0,05$ ).

### 3.5.2. Erhöhung der intrazellulären $Ca^{2+}$ -Konzentration durch Thapsigargin

Durch Anheben der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration mit dem Inhibitor der endoplasmatischen  $Ca^{2+}$ -ATPase Thapsigargin (abgekürzt TG) ließ sich die TF-Expression in Analogie zu der Stimulation durch IL-1 $\beta$  oder DOG signifikant steigern (Abb. 3.9 – 3.12). Thapsigargin bewirkt eine Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus Speichern im Zytosol und ruft einen Einstrom von  $Ca^{2+}$  über die Plasmamembran hervor (26, 64, 120). So konnten für eine Stimulation mit Thapsigargin in einer Konzentration von 100 nM eine Steigerung des TF-mRNA-Levels von  $32 \pm 11$  auf  $65 \pm 10$  rel. Einh. (Abb. 3.11), des TF-Proteins von  $24,5 \pm 1,3$  auf  $43,1 \pm 3,2$  ng/mg (Abb. 3.12) ermittelt werden; im Vergleich dazu ergaben sich für IL-1 $\beta$  – wie dargestellt – Steigerungen auf  $87 \pm 6$  rel. Einh. bzw. auf  $38,1 \pm 2,1$  ng/mg Protein.

So ist festzustellen, dass Stimulanzen, die entweder TF zu erhöhen vermögen oder die IL-1 $\beta$  induzierte Steigerung des TF blockieren können, ihre Effekte auf den mRNA- und den Protein-Level in paralleler Weise ausüben (vgl. Abb. 3.9 – 3.12).

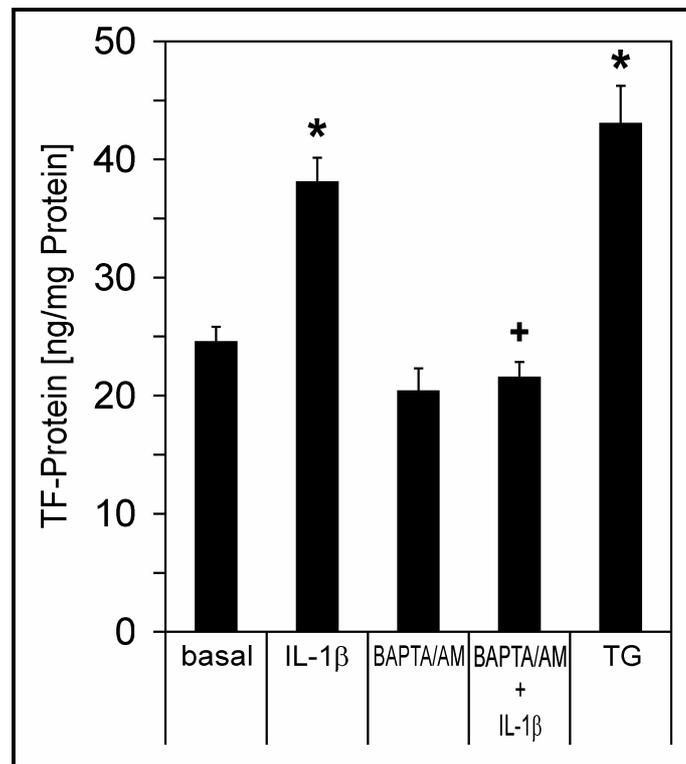


Abb. 3.12: TF-Proteinmessungen im ELISA (16 h Inkubationszeit): In Analogie zur RNA-Ebene steigert TG (100 nM) genauso wie IL-1 $\beta$  (25 U/ml) signifikant die TF-Proteinkonzentration im Zelllysate (\* $p < 0,05$  im Vergleich zum basalen Wert); Koinkubation mit BAPTA/AM (10  $\mu$ M) und IL-1 $\beta$  blockiert den IL-1 $\beta$ -abhängigen Stimulationseffekt in signifikanter Weise (+ $p < 0,05$  im Vergleich zu IL-1 $\beta$ -Stimulation).

### **3.6. Negativ regulierender Einfluss der Proteinkinase A auf die TF-Expression**

#### **3.6.1. Verminderung des TF durch cAMP-abhängige Aktivierung der Proteinkinase A**

Abb. 3.13 und 3.14 demonstrieren, dass der Mechanismus der TF-Stimulation in Mesangiumzellen mit der Runterregulation der Proteinkinase A verknüpft ist. So ist 8-bromo-cAMP (abgekürzt 8-br-cAMP) als zellpermeables cAMP-Analogon in der Lage, die Proteinkinase A (abgekürzt PKA) zu aktivieren. In einer Konzentration von 0,5 mM hebt 8-bromo-cAMP die IL-1 $\beta$ -abhängige Induktion von TF soweit auf, dass mit  $34\pm 6$  rel. Einh. (Abb. 3.13) bzw.  $26,5\pm 2,5$  ng/mg Protein (Abb. 3.14) praktisch der basale Ausgangswert ( $32\pm 11$  rel. Einh.,  $24,5\pm 1,3$  ng/mg Protein) wieder erreicht wird. Den gleichen reversiblen Effekt zeigt auch Forskolin in einer Konzentration von  $10\mu\text{M}$  ( $37\pm 9$  rel. Einh. bzw.  $17,0\pm 2,5$  ng/mg Protein). Forskolin ist ein zellpermeabler Aktivator der Adenylatzyklase, der die Proteinkinase A über die erhöhte Freisetzung von cAMP induziert.

Beide Stoffe, 8-bromo-cAMP und Forskolin, sind aber nicht in der Lage, unabhängig von IL-1 $\beta$  mit der basalen Expression von TF in signifikanter Weise zu interagieren, weder auf mRNA-Ebene noch auf Proteinebene: In der semiquantitativen RT-PCR wurden für 8-bromo-cAMP (0,5 mM)  $26\pm 3$  rel. Einh., für Forskolin ( $10\mu\text{M}$ )  $19\pm 3$  rel. Einh. ermittelt bei einem basalen Vergleichswert von  $32\pm 11$  rel. Einh. (wachstums-arretierte MZ in 0,5%igem FCS-haltigem Medium). Analoge Daten lassen sich auch für TF-Protein in lysierten Mesangiumzellen finden: Den Ausgangswert von  $24,5\pm 1,3$  ng/mg Gesamtprotein überschreitet die mit 8-bromo-cAMP stimulierte Zellpopulation nur geringfügig und nicht signifikant mit  $26,0\pm 2,7$  ng/mg Gesamtprotein; der basale Vergleichswert wird bei Stimulation mit Forskolin leicht, aber nicht signifikant unterschritten ( $19,0\pm 3,4$  ng/mg Protein).

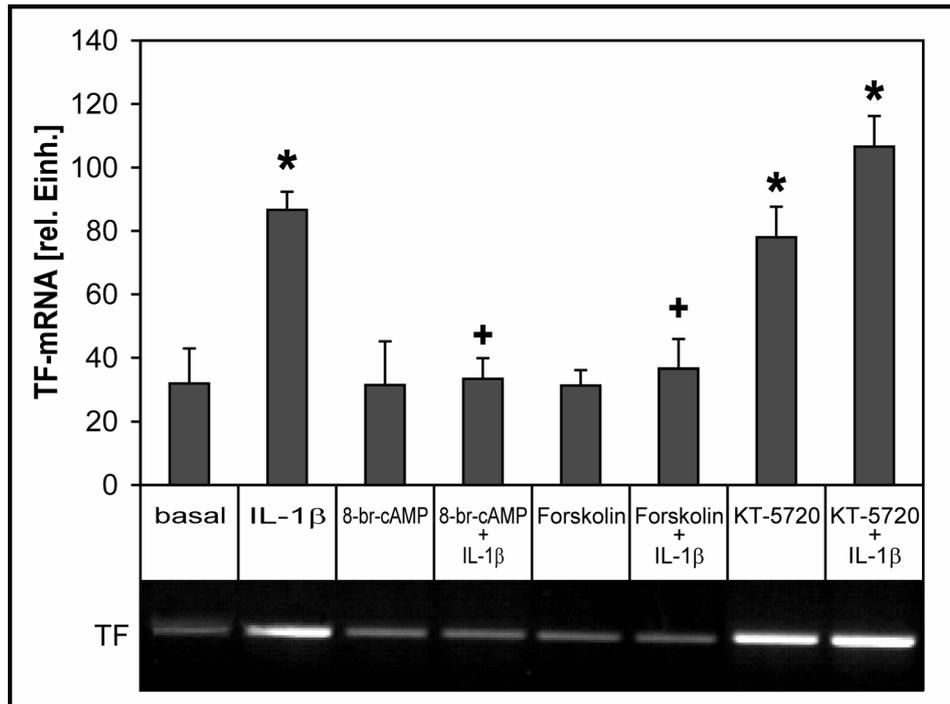


Abb. 3.13: Proteinkinase A ist als negativer Regulator an der TF-mRNA-Expression beteiligt: Eine TF-Stimulation ist mit einer durch KT-5720 (5  $\mu$ M) bewirkten Suppression der PKA assoziiert (\* $p < 0,05$ ), ihre Aktivierung durch 8-bromo-cAMP (0,5 mM) und Forskolin (10  $\mu$ M) führt zur vollständigen Blockierung einer sonst durch IL-1 $\beta$  ausgelösten Expressionssteigerung von TF-mRNA (+ $p < 0,05$ ).

### 3.6.2. Steigerung von TF durch selektive Inhibition der Proteinkinase A

Eine Blockierung der Proteinkinase A hingegen durch Stimulation der Mesangiumzellen mit KT-5720 (chem. Formel: [9R,10S,12S]-2,3,9,10,11,12-Hexahydro-10-hydroxy-9-methyl-1-oxo-9,12-epoxy-1H-diindolo [1,2,3-fg:3,2,1-kl] pyrrolo[3,4-l][1,6] benzodiazocine-10-carboxylic acid hexyl ester), das als zellpermeabler, spezifischer Inhibitor der Proteinkinase A in einer Konzentration von 5  $\mu$ M eingesetzt wurde, steigerte signifikant die TF-mRNA-Produktion von  $32 \pm 11$  auf  $78 \pm 10$  rel. Einh. und den TF-Proteingehalt der lysierten Zellen von  $24,5 \pm 1,3$  auf  $36,3 \pm 4,9$  ng/mg Protein, ohne dass – wenn auch auf PCR-Ebene sichtbare, aber nicht signifikante – additive Effekte durch Koinkubation mit IL-1 $\beta$  und KT-5720 erreicht werden konnten ( $107 \pm 10$  rel. Einh. bzw.  $40,7 \pm 2,5$  ng/mg Protein). Damit ist die Proteinkinase A vermutlich als ein intrinsischer Inhibitor am Mechanismus der TF-Expression in Mesangiumzellen beteiligt.

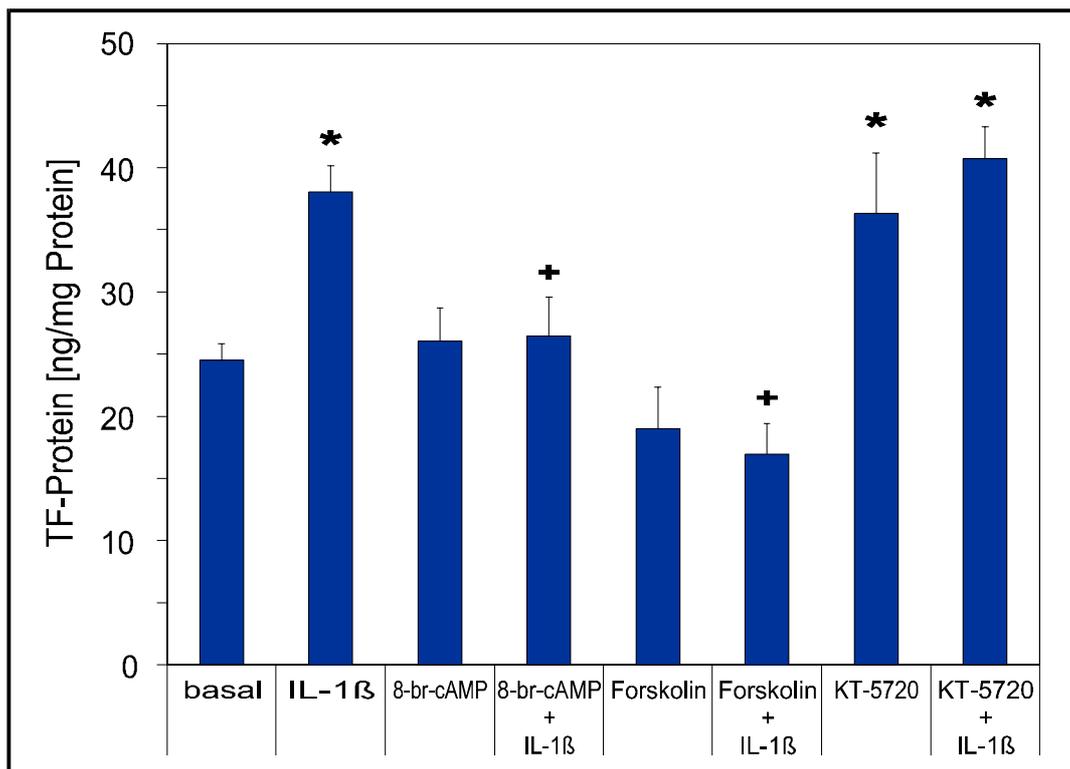


Abb. 3.14 : Balkendiagramm zur TF-Proteinmessung im ELISA: In Analogie zur RNA-Ebene (Abb. 3.13) blockieren 8-bromo-cAMP und Forskolin die IL-1 $\beta$ -abhängige Induktion von TF (+p<0,05 im Vergleich zu IL-1 $\beta$ ). KT-5720 als Inhibitor der PKA steigert wie IL-1 $\beta$  signifikant die TF-Proteinkonzentration im Zelllysate (\*p<0,05 im Vergleich zum basalen Wert); die Koinkubation mit KT-5720 und IL-1 $\beta$  ergibt keinen signifikanten additiven Effekt.

### 3.7. Apoptoseinduktion in Mesangiumzellen und ihre Auswirkungen auf die TF-Aktivität in Kulturmediumüberständen

#### 3.7.1. Induktion des programmierten Zelltods durch Wasserstoffperoxid

Durch Behandlung der wachstumsarretierten MZ mit Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in einer Konzentration von 10 $\mu$ M über 24 h konnte der programmierte Zelltod (Apoptose) induziert werden. Der Apoptosenachweis erfolgte mittels Anfärbung der im Zellkern enthaltenen DNA mit Propidiumjodid und deren durchflusszytometrischer Messung (siehe Kapitel 2.4.6). Abb. 3.15 zeigt jeweils typische Dotplots für vitale (obere Reihe) und apoptotische Zellen (untere Reihe), bei denen der DNA-Gehalt und damit das Propidiumjodid-Signal (vgl. obere Reihe) durch die Apoptose-assoziierte endonukleolytische DNA-Fragmentierung abgenommen hat.

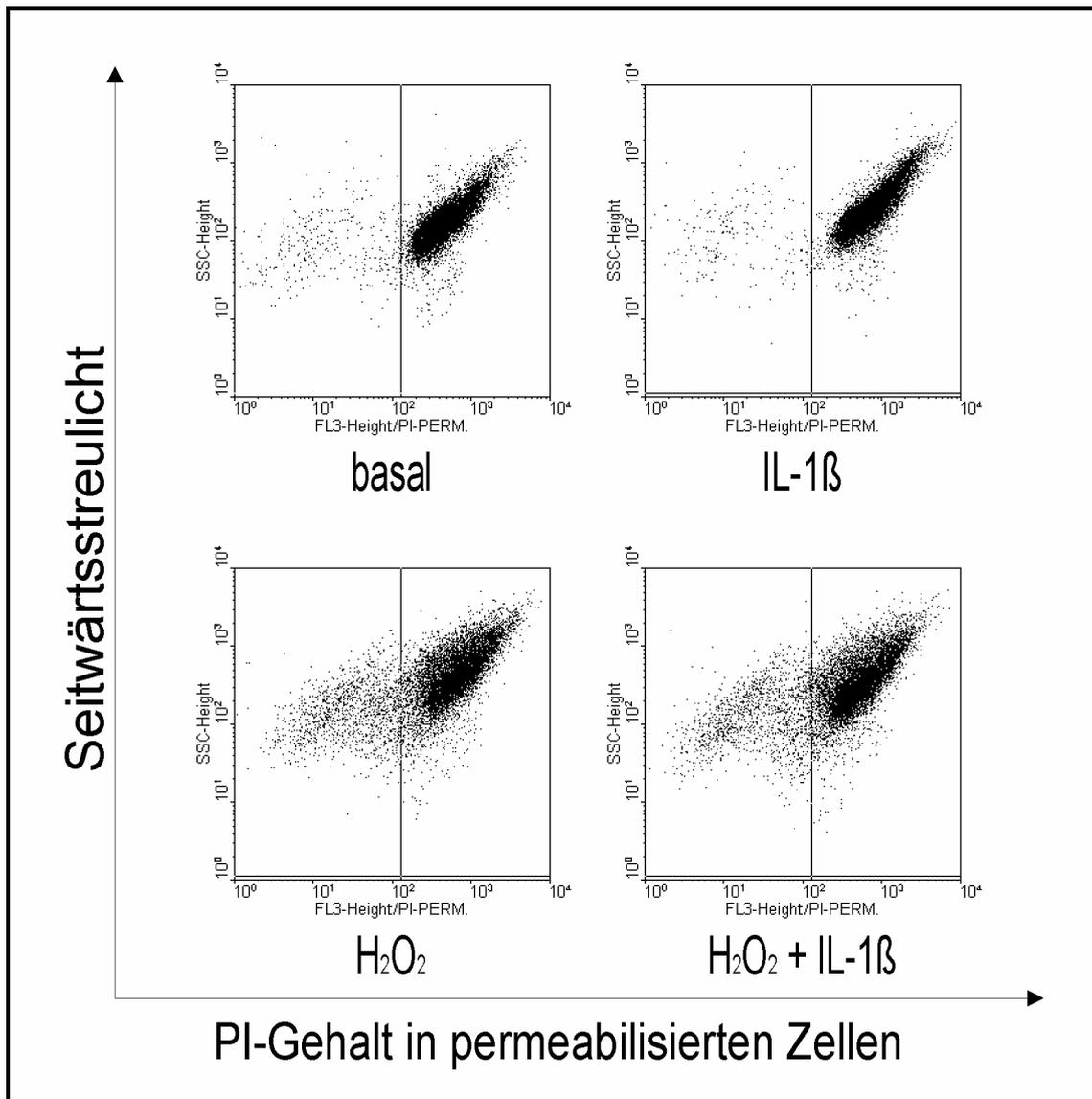


Abb. 3.15: Dotplot-Auswertung der flowzytometrischen Untersuchung an Mesangiumzellen bzgl. der DNA-Anfärbbarkeit ihrer Zellkerne mit Propidiumjodid als Apoptosenachweis (X-Achse). Die Auftragung erfolgt gegen das Seitwärtsstreulicht (Y-Achse) als Maß für die Zellgröße.

Die basale Apoptoserate der Mesangiumzellen lag bei  $5,0 \pm 2,5\%$ , ohne deren signifikante Beeinflussung durch Zugabe von 25 U/ml IL-1 $\beta$  ( $4,5 \pm 2,8\%$ ). Die Behandlung mit Wasserstoffperoxid führte nach 24-stündiger Inkubation zu einer signifikanten Erhöhung des Prozentsatzes an apoptotischen Zellen auf  $17,7 \pm 3,0\%$ , ebenfalls ohne Interferenz mit einer zusätzlichen Applikation von IL-1 $\beta$  ( $16,1 \pm 3,6\%$ ), wie in Abb. 3.16 als Balkendiagramm dargestellt.

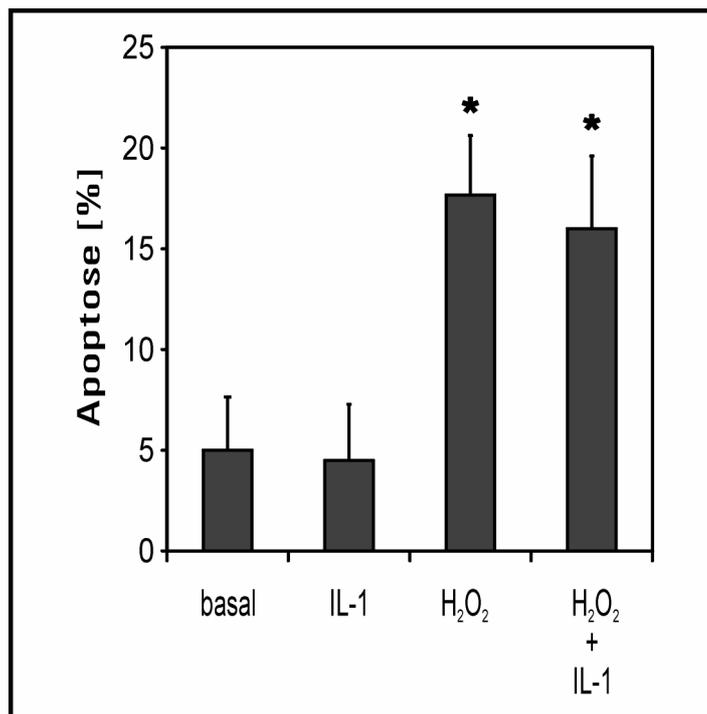


Abb. 3.16: Eine Apoptose-Induktion in Mesangiumzellen kann durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 μM) nach 24 h Inkubation in signifikanter Weise ausgelöst werden (\* p<0,05). Diese wird nicht signifikant durch Koinkubation mit IL-1β beeinflusst.

### 3.7.2. Exponentieller Anstieg der TF-Aktivität durch IL-1β-stimulierte, apoptotische Mesangiumzellen

Die Bestimmung der TF-Aktivität (Abb. 3.17) in den Zellkulturüberständen der zuvor auf ihre Apoptoserate hin untersuchten vier verschiedenen Ansätze kann zeigen, dass von apoptotischen Zellen eine signifikant höhere Menge an TF-Aktivität (83±13 pM) in die Umgebung freigesetzt wird, wenn man diese mit den Werten für unstimulierte vitale Mesangiumzellen (41±11 pM) bzw. mit den Werten für IL-1β-stimulierte (54±15 pM) vergleicht (24 h Inkubation).

Mesangiumzellen, die zuerst mit IL-1β stimuliert wurden und in denen anschließend durch Wasserstoffperoxid (10 μM) Apoptose ausgelöst wurde, setzen TF-Aktivität in noch zusätzlichem, stark vermehrtem Maße in den Zellkulturüberstand frei (150±13 pM).

Es zeigt sich also, dass die Induktion von Apoptose in MZ durch  $H_2O_2$ , die allein schon zu einem signifikanten Anstieg der TF-Freisetzung in die Überstände der Zellkultur führt, darüber hinaus durch IL-1 $\beta$ -Stimulation exponentiell gesteigert werden kann.

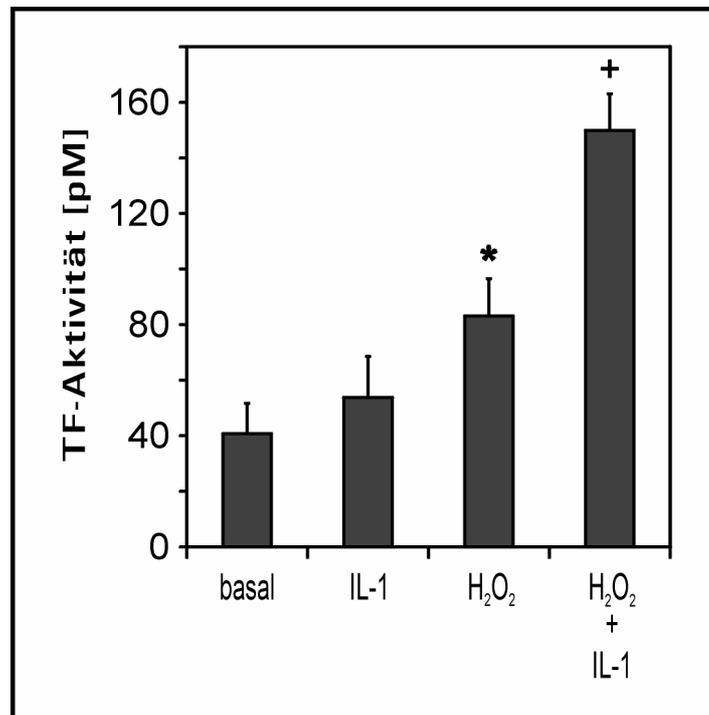


Abb. 3.17: TF-Aktivität in den Kulturmediumüberständen vitaler und apoptotischer Mesangiumzellen in Abhängigkeit von der Stimulation mit IL-1 $\beta$  (25 U/ml):  $H_2O_2$  als Apoptose-Induktor bewirkt allein oder in Kombination mit IL-1 $\beta$  einen im Vergleich zum basalen Wert (vitale Zellen) signifikanten Anstieg der TF-Aktivität (\* $p < 0,05$  im Vergleich zum basalen Wert). Die Koinkubation mit IL-1 $\beta$  führt darüber hinaus zu ebenfalls deutlich gesteigerter TF-Aktivität gegenüber der Inkubation mit  $H_2O_2$  allein (+ $p < 0,05$  im Vergleich zu  $H_2O_2$ ).

## **4. Diskussion**

### **4.1. Konsequenzen und Ursachen der TF-Hochregulation**

#### **4.1.1. Hyperkoagulation bei diversen Nierenerkrankungen**

Ein lokale Verschiebung der Hämostase hin zu einer gesteigerten Aktivierung des Gerinnungssystems und seiner prokoagulatorischen Faktoren im Sinne einer „Hyperkoagulation“ tritt bei zahlreichen Nierenerkrankungen in Erscheinung, sei es in vivo oder experimentell. Es existiert eine Reihe von Beweisen dafür, dass diese Gerinnungsaktivierung in der Niere mit der Schädigung von Glomerula eng verknüpft ist (66). Die glomeruläre Ablagerung von Fibrin und die Anwesenheit von kapillären Mikrothromben oder ein vollständiger Verschluss der glomerulären Kapillaren sind dabei die pathohistologischen Zeichen einer exzessiv gesteigerten prokoagulatorischen Aktivität (48).

#### **4.1.2. Fibrinablagerungen und PCA im Glomerulum**

Mittels immunologischer Methoden kann man Fibrinogen-, Fibrin- und Thrombin-Antigen nachweisen, welche als histopathologische Marker der pathologischen Situation dienen. Bei einem Drittel der Patienten mit Glomerulonephritis konnten Fibrinablagerungen nachgewiesen werden (97). Noch dramatischer ist die Beobachtung von massiver prokoagulatorischer Aktivität, die aus der Niere selbst stammt, beim akuten Nierenversagen im Zusammenhang mit disseminierter intravasaler Gerinnung oder dem hämolytisch-urämischen Syndrom (47, 88, 109). Bei diesen Entitäten könnten die Anzeichen einer hyperaktiven Gerinnung sogar als prognostisch relevante Marker benutzt werden.

Fibrinablagerungen können die glomerulären Strukturen auf mehrfache Weise direkt beschädigen: Sie unterbrechen den Blutfluss in den glomerulären Kapillaren oder lösen aufgrund des erhöhten Druckes die Bildung von Aneurysmen aus. Des Weiteren können sie direkt zytotoxisch auf Mesangiumzellen wirken und leisten ihren Anteil bei Entzündungsreaktionen mit Chemoattraktion von Monozyten und Makrophagen (48, 129).

#### **4.1.3. Eingewanderte Monozyten/Makrophagen in den Glomerula der Niere**

Dass die im Mesangium befindlichen Zellen in einem hohen Maße zur Aktivierung der Gerinnung beitragen, wurde früher damit begründet, dass eingewanderte aktivierte Monozyten bzw. Makrophagen durchaus als reichhaltige Quelle prokoagulatorischer Aktivität bekannt sind (60), wobei es inzwischen eher fraglich ist, ob dies die einzige und auch noch bedeutendste Quelle der auch schon vor Jahren im Glomerulum nachgewiesenen PCA ist (33, 36, 48). Es wurde von einer Anreicherung der glomerulären PCA nämlich auch unter solchen Konstellationen berichtet, wo nur wenige Monozyten/Makrophagen in den Glomerula gefunden werden konnten: bei durch Quecksilberchlorid induzierter Autoimmunglomerulonephritis und im Rahmen einer Sanarelli-Shartzmann-Reaktion beim Hasen (17, 67). Dies impliziert, dass auch ein Mechanismus existiert, der nicht die Anwesenheit von Monozyten/Makrophagen erforderlich macht und dennoch in einer Erhöhung der PCA zu resultieren scheint.

Die Ergebnisse meiner Arbeit belegen nun, dass auch humane Mesangiumzellen selbst als ortsansässige Zellen unter Kulturbedingungen in der Lage sind, auf mRNA-Ebene und Proteinebene TF zu synthetisieren.

Wie dem im Ganzen auch sei, die eingewanderten Monozyten bzw. Makrophagen erlangen zusätzlich eine gewichtige Bedeutung in ihrer Eigenschaft, Zytokine zu bilden, einschließlich TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , welche dann – wie weiter unten ausgeführt – die Endothelzellen oder auch Mesangiumzellen zur TF-Expression anregen (11, 96, 139). Die Steigerung der Produktion von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  konnte in Assoziation mit der Infiltration von Makrophagen für die Anti-Basalmembran-Glomerulonephritis beim Hasen nachgewiesen werden (131, 133).

#### **4.1.4. Bedeutung und Eigenschaften von TF**

TF als der Initiator der Gerinnungskaskade und Rezeptor oder Kofaktor für den Gerinnungsfaktor VII/VIIa (5) wird in der Regel auf der Zelloberfläche von Fibroblasten und glatten Muskelzellen gefunden (61, 122, 138). Hier kann TF mit den im Blut vorhandenen, so genannten „plasmatischen“ Gerinnungsfaktoren interagieren, sobald durch eine Gewebeschädigung bzw. Verletzung eines Gefäßes seine

Abschirmung vom Blut aufgrund der Endothelzellauskleidung des Gefäßes unterbrochen wurde (20).

Gewebsthromboplastin beteiligt sich auch an zellulären Signalübertragungsmechanismen, entweder mittels der proteolytischen Reaktion, bei der Tissue Factor mit seinem physiologischen Liganden, dem Gerinnungsfaktor VII, im extrazellulären Kompartiment interagiert oder mittels der kurzen zytoplasmatischen Region des TF-Moleküls, über die es an der intrazellulären Signalübertragung beteiligt ist; dies läuft aber unabhängig von der proteolytischen Funktion des TF/Faktor-VII/VIIa-Komplexes ab (104, 119).

Ziel meiner Arbeit war aber nicht, die nachfolgenden (auch klinischen) Konsequenzen der TF-Hochregulation in Mesangiumzellen zu beleuchten, die vermutlich zahlreich sind, wie man aus den Untersuchungen an anderen Zellen erwarten kann (95), sondern es sollte hier untersucht werden, inwiefern erstens Mesangiumzellen überhaupt TF auf mRNA- und Protein-Ebene exprimieren und nachfolgend TF-Aktivität hervorbringen. Zweitens sollten in dieser Arbeit grundsätzliche intrazelluläre Einflussgrößen für die TF-Regulation aufgedeckt werden.

## **4.2. TF in Mesangiumzellen**

### **4.2.1. Zytokin-induzierte TF-Expression**

So wird anhand meiner Untersuchungen deutlich, dass proinflammatorische Mediatoren, wie zum Beispiel IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und LPS, die TF-Expression in hohem Maße anzuregen vermögen. Eine vorhergehende Studie von Wiggins et al. aus dem Jahre 1990 (139) untersuchte bereits die prokoagulatorische Aktivität von Mesangiumzellen aus Rattennieren. Dabei konnte eine Stimulation der PCA durch TNF- $\alpha$  und LPS gefunden werden. Es konnte aber nur als Schlussfolgerung behauptet werden, dass die gemessene PCA durch Tissue Factor bedingt war. In der damaligen Studie wurde die TF-Aktivität nämlich lediglich indirekt durch Aufspüren von prokoagulatorischer Aktivität in einem funktionellen Blutgerinnungstest untersucht, aber nicht auf direktem Wege. Das heißt, es wurden keine Daten zur TF-Expression auf mRNA- und Protein-

Ebene ermittelt, die mit dieser Arbeit nun umfangreich vorliegen und sich darüber hinaus auf humane Mesangiumzellen beziehen. So mag auch die Verwendung humaner Mesangiumzellen statt solcher aus Rattennieren sowie die Anwendung differenzierterer, für TF spezifischerer analytischer Methoden der Grund dafür sein, dass – neben der von Wiggins et. al. beschriebenen erfolgreichen Stimulation mittels TNF- $\alpha$  und LPS – in meinen Untersuchungen zusätzlich auch IL-1 $\beta$  eine signifikant gesteigerte Expression von TF-mRNA und TF-Protein bewirken konnte. Diese Steigerung konnte in der Studie von Wiggins et al. (139) nicht gezeigt werden: Vielleicht war eine Inkubationszeit von nur 6 Stunden zu kurz gewählt, wenn bei der zeitabhängigen Stimulation humaner Mesangiumzellen in Kultur mit IL-1 $\beta$  von mir ein Maximum der TF-mRNA-Expression erst nach 12 Stunden gefunden wurde, was auch übereinstimmend Grandaliano et al. in dem während meiner Studien erschienenen Artikel (48) berichten. Damit dürfte das Maximum einer auf der Denovo-Synthese von TF-Protein beruhenden Erhöhung der TF-Aktivität frühestens zeitgleich oder aber eher noch später erfolgen.

#### **4.2.2. Expression in Abhängigkeit vom Zellzyklus**

In Analogie zu Wiggins' Untersuchungen der PCA anhand der Mesangiumzellen aus Rattennieren exprimieren die humanen Mesangiumzellen in Zellkultur aber auch ohne Zytokin-abhängige Stimulation Tissue Factor: Vor allem in der Proliferationsphase geschieht dies in hohem Umfang; unter Serumentzug und damit einhergehender Wachstumsarretierung, was wohl eher der physiologischen Situation in der menschlichen Niere entspricht, weisen MZ einen deutlich geringeren, basalen Level auf, wie dies auch Wiggins et al. mit ihren Untersuchungsmethoden indirekt gefunden haben.

Das Verhältnis zwischen dem Zellzyklus und der TF-Expression durch Mesangiumzellen wurde allerdings in meinen Untersuchungen nicht weiter gehend entschlüsselt; im Ergebnis passen meine Beobachtungen jedoch zu Befunden, dass das TF-Gen in einer Fibroblastenlinie durch Wachstumsfaktoren regulierbar ist (56).

### 4.3. Intrazelluläre Signalwege und molekulare Mechanismen

Bei den Fragestellungen zu den intrazellulären Signalwegen, die von IL-1 $\beta$  zur Aktivierung von Zellen benutzt werden, lag besonders die Rolle der Proteinkinasen im Mittelpunkt des Interesses (100). Dabei stehen auf dem Gebiet der IL-1 $\beta$ -abhängigen Signaltransduktion wesentlich mehr Daten für Lymphozyten als für Mesangiumzellen zur Verfügung (69, 76, 89).

#### 4.3.1. Proteinkinase C

Ausgehend von der Fragestellung, ob die Proteinkinase C, ein Protein-Phosphorylierungsenzym, als intrazellulärer Signalüberträger bei der IL-1 $\beta$ -Induktion von TF in Mesangiumzellen mitwirkt, wurde in meiner Arbeit der selektive PKC-Inhibitor Calphostin C eingesetzt. Dieser erlangt im Gegensatz zu anderen früher allgemein eingesetzten Inhibitoren seine Spezifität in Bezug auf die Proteinkinase C durch Wirkung über eine Diacylglycerol-Bindungsstelle, die einzigartig für die Proteinkinase C ist (70).

Daher ist davon auszugehen, dass bei ausbleibender TF-Induktion bei Einwirken von Calphostin C tatsächlich eine Aktivierung der Proteinkinase C notwendig ist, um die Expression von TF in Mesangiumzellen zu induzieren. Eine direkte Aktivierung der Proteinkinase C mittels DOG brachte folglich ein zur IL-1 $\beta$ -Stimulation identisches Ergebnis sowohl auf der mRNA- als auch auf der Protein-Ebene. Nach Literaturlage kann außerdem weitgehend ausgeschlossen werden, dass die Inhibition der TF-mRNA mit Calphostin C aus einer unspezifischen Zellschädigung resultiert (128).

Die Proteinkinase-C-abhängige Regulation von Zytokine-induzierter TF-Transkription wurde für Endothelzellen bereits beschrieben (106, 128). Belege dafür, dass Zytokine wie IL-1 $\beta$  auch in Mesangiumzellen eine direkt gemessene Stimulation verschiedener Proteinkinase-C-Isoformen bewirken, verdichten die Hypothese einer für Mesangiumzellen bestehenden Analogie (46). Ergänzend wurde beobachtet, dass IL-1 $\beta$  erstens in Mesangiumzellen und zweitens PKC-abhängig letztlich die Gen-Expression einiger anderer Proteine anregen kann: z. B. „monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP-1) (117), Stromyelin (145) und Metalloproteinase-9 (144).

### 4.3.2. Intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

Der Vorgang der IL-1 $\beta$ -induzierten TF-Expression war des Weiteren abhängig vom Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Die Aktivität einiger Isoformen der Proteinkinase C ist als  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig bekannt (34). Daher darf mit der Steigerung der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch Thapsigargin durchaus ein Anstieg des TF-mRNA-Levels erwartet werden, wenn eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Proteinkinase-C-Isoform hieran beteiligt ist. Dies korreliert auch mit meinen Beobachtungen, dass die intrazelluläre Chelation von  $\text{Ca}^{2+}$  als indirekte Hemmung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen PKC-Isoformen genauso den TF-mRNA- und TF-Protein-Level supprimiert, wie dies Calphostin C mittels direkter Hemmung tut.

### 4.3.3. Proteinkinase A

Darüber hinaus weist diese Arbeit darauf hin, dass die Proteinkinase A als intrinsischer inhibitorischer Regulationsmechanismus auf die TF-Expression einwirkt, insofern, als ein intrazellulärer cAMP-Anstieg die Zytokin-induzierte TF-Hochregulation zunichte machen kann. Auf der anderen Seite kann ein spezifischer Inhibitor der Proteinkinase A, die Substanz KT-5720, diesen negativen Regulationseinfluss der PKA antagonisieren und selbst die Neubildung von Gewebsthromboplastin in Mesangiumzellen induzieren, was durch gesteigerte TF-mRNA-Expression und einen erhöhten intrazellulären TF-Proteingehalt zum Ausdruck kommt. Diese cAMP-abhängige Suppression von prothrombotischen Effekten in Verbindung mit TF-Induktion wurde in früheren Studien belegt, zum Beispiel bei Monozyten. Im Ganzen scheint die Beeinflussung der TF-Expression via Proteinkinase A durchaus ein in den unterschiedlichen Zellarten vorhandenes und bewährtes Prinzip widerzuspiegeln (81, 101).

Durch die Gewinnung solcher Erkenntnisse über die intrazellulären Signalwege lassen sich pharmakologische Einflussmöglichkeiten entwickeln, so dass Fibrinablagerungen möglicherweise in der Zukunft effektiv in vivo verhindert werden können. Anhand neuer Behandlungsmöglichkeiten entfele dann ihr durchaus erheblicher Anteil an den glomerulären Schädigungen derartiger Nierenerkrankungen.

## **4.4. Mesangiumzellen und Apoptose**

### **4.4.1. TF-Aktivität in Abhängigkeit von Phosphatidylserin**

Zum Teil ist TF zwar auf der Oberfläche von Zellen vorhanden, aber aufgrund einer Art „Verschlüsselung“ des TF-Moleküls nicht vollständig aktiv (114). Erst wenn die Zellen eine Schädigung erfahren, entwickelt TF seine volle Aktivität (20, 79).

Dieser Vorgang ist auch für die Apoptose der Mesangiumzellen relevant, und zwar für die Annahme, dass vollständig aktiver TF erst auf der Zelloberfläche durch die Wechselwirkung mit der Zellmembran funktionell aktiv werden kann. Das Potential des zellgebundenen Komplexes aus TF und Faktor VIIa zur enzymatischen Aktivierung der Gerinnungsfaktoren IX und X wird nämlich streng limitiert durch die Verfügbarkeit von Phosphatidylserin zur Assoziation mit den Substraten (38, 72, 73). Das heißt, dass an der Außenseite der Zelloberflächenmembran angereichertes oder in die Umgebung abgegebenes Phosphatidylserin ein Modulator der TF-Aktivität ist, was belegt werden kann durch Studien, bei denen TF-Apoprotein, das in Phospholipidvesikeln mit Phosphatidylserin aufbereitet wurde, eine wesentlich höhere PCA aufbrachte als TF-Apoprotein, das in Phosphatidylserin-freien Phospholipidvesikeln rekonstituiert wurde (4, 114). Gerade solche Zellen, die über den Apoptoseweg zugrunde gehen, erhöhen typischer Weise ihre Expression und Freisetzung von Phosphatidylserin, was sich der Apoptosenachweis mittels Annexin V, das an Phosphatidylserin bindet, zunutze macht.

### **4.4.2. Erhöhte TF-Aktivität an der Zelloberfläche und in den Kulturüberständen apoptotischer Zellen**

Die apoptotischen Zellen zeigen gleichzeitig eine erhöhte TF-Oberflächenaktivität (13, 50). Auf diesen Aspekt wurde allerdings in dieser Arbeit nicht näher eingegangen, stattdessen wurde die Freisetzung des löslichen Tissue Factors – der extrazellulären Membrandomäne – in die Überstände der Zellkulturflaschen als Messgröße der TF-Aktivität benutzt.

Hier zeigte sich, dass apoptotische Mesangiumzellen eine signifikant höhere Menge an TF-Aktivität in ihre Zellkulturüberstände abgeben, als dies bei intakten Zellen der Fall ist. Nach der Induktion von Apoptose mittels Wasserstoffperoxid wird vermutlich

intrazellulär gebundener TF freigesetzt, der zuvor nicht in den Überständen der intakten Zellen gefunden werden konnte, obwohl in dieser Arbeit durchaus nachgewiesen werden konnte, dass IL-1 $\beta$ -stimulierte Mesangiumzellen in signifikantem Maße TF neu bilden, der auch in Zelllysaten nachweisbar ist. Er ist als solcher bereits funktionsfähig, denn mit der Steigerung der TF-Proteinkonzentration in den Zelllysaten geht auch ein Anstieg der TF-Aktivität einher.

Da andere Apoptose-induzierende Stimuli wie zum Beispiel UV-Licht gleiche Effekte zeigten, ist ausgeschlossen, dass Wasserstoffperoxid von sich aus als direkter Stimulus für die Freisetzung von intrazellulär eingeschlossenem Tissue Factor verantwortlich ist. Außerdem führten proinflammatorische Stimuli zu einer weiteren signifikanten Erhöhung der TF-Aktivität im Vergleich zu Zellen, in denen Apoptose ohne eine Vorinkubation mit proinflammatorischen Zytokinen ausgelöst worden war. So lässt sich aus diesen Daten folgern, dass mindestens zwei Reize benötigt werden, damit Mesangiumzellen hohe Mengen an TF in ihre Umgebung bzw. in der Zellkultur in ihre Überstände abgeben: Ein erstes inflammatorisches Signal und zusätzlich ein zweites Apoptose-induzierendes Signal.

#### **4.4.3. Proliferativer Stimulus anstatt proinflammatorischer Reize**

Der proinflammatorische Reiz ist evtl. auch durch einen proliferativen Stimulus substituierbar, schließlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass proliferierende Mesangiumzellen genauso effektiv TF bilden können wie ruhende, Zytokin-stimulierte Zellen. Da unter physiologischen Bedingungen die Mesangiumzellen beim Gesunden nicht proliferieren, ist auch dieser Aspekt vornehmlich in pathologischen Situationen relevant, z. B. bei den Formen der Glomerulonephritis, wo solche proliferierenden Mesangiumzellen beschrieben worden sind.

#### **4.4.4. Mesangiumzellwachstum und Apoptose bei glomerulären Erkrankungen**

Die Interaktion zwischen Mesangiumzellwachstum und Apoptose wurde bei diversen glomerulären Erkrankungen beschrieben, zum Beispiel „Anti-Thy1“-Nephritis, aber ebenfalls auch in kultivierten Mesangiumzellen beobachtet (6, 55, 120). Obwohl Apoptose dazu beitragen könnte, nach Einwirken eines proliferativen Signals eine

erhöhte Zellzahl im Glomerulum zu verkleinern, könnte genau diese Ereignissequenz aber auch das Substrat für die beobachtete Induktion und Freisetzung von Tissue Factor und den Anstieg der prokoagulatorischen Aktivität sein, was dann leider ungünstige Konsequenzen nach sich zieht (50).

Eine Lupus-assoziierte Nephritis könnte als geeignetes Beispiel für den Zusammenhang von Apoptose und verstärkter Aktivierung des Gerinnungssystems bei menschlichen Nierenerkrankungen dienen. Die systemische Lupus-Erkrankung wird durch Anzeichen einer generellen Tendenz zur Zellalterung und zum apoptotischen Zelluntergang charakterisiert; bei dieser Erkrankung wurden auch apoptotische Zellen innerhalb des Glomerulums beschrieben (10, 71, 107). In speziellem Interesse liegt insbesondere bei der Lupus-assoziierten Nephritis als histologisches Merkmal die Ausbildung von Mikrothromben in den glomerulären Kapillaren zusammen mit oder gänzlich ohne andere prothrombotische Faktoren, wie zum Beispiel Antiphospholipid-Antikörper (62).

#### **4.5. Zusammenfassende Schlussbetrachtung**

In dieser Arbeit konnten eine Zytokin-abhängige Expression und Freisetzung von Gewebsthromboplastin in Mesangiumzellen aufgedeckt und einige beteiligte intrazelluläre Signalübertragungswege beleuchtet werden.

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen unterstreichen den Beitrag der Mesangiumzellen an einer evtl. vorhandenen erhöhten prokoagulatorischen Aktivität, sofern diese durch TF bedingt ist. Meine Beobachtungen weisen außerdem auf ein bei Nierenerkrankungen bestehendes Netzwerk von Interaktionen zwischen Mesangiumzellen, aus anderen Zellen freigesetzten inflammatorischen Botenstoffen und Apoptoseereignissen hin, die resultierend durch lokale intrakapilläre Gerinnung gekennzeichnet sind.

## **5. Literatur**

1. Al-Saady NM, Leatham EW, Gupta S, Kwan JT, Eastwood JB, Seymour CA (1999) Monocyte expression of tissue factor and adhesion molecules: the link with accelerated coronary artery disease in patients with chronic renal failure. *Heart* 81: 134-140
2. Atkins RC, Holdsworth SR, Glasgow EF, Matthews FE (1976) The macrophagen in human rapidly progressive glomerulonephritis. *Lancet* 1: 830-832
3. Atkins RC, Nikolic-Paterson DJ, Song Q, Lan HY (1996) Modulators of crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 7: 2271-2278
4. Bach R, Rifkin DB (1990) Expression of tissue factor procoagulant activity: regulation by cytosolic calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 6995-6999
5. Bach RR (1998) Mechanism of tissue factor activation on cells. *Blood Coagul Fibrinolysis* 9 Suppl 1: S37-S43
6. Baker AJ, Mooney A, Hughes J, Lombardi D, Johnson RJ, Savill J (1994) Mesangial cell apoptosis: the major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental mesangial proliferative nephritis. *J Clin Invest* 94: 2105-2116
7. Banas B, Luckow B, Moller M, Klier C, Nelson PJ, Schadde E, Brigl M, Halevy D, Holthofer H, Reinhart B, Schlondorff D (1999) Chemokine and chemokine receptor expression in a novel human mesangial cell line. *J Am Soc Nephrol* 10: 2314-2322
8. Banner DW, D'Arcy A, Chene C, Winkler FK, Guha A, Konigsberg WH, Nemerson Y, Kirchhofer D (1996) The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature* 380: 41-46
9. Bazan JF (1990) Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 6934-6938

10. Berden JH, van Bruggen MC (1997) Nucleosomes and the pathogenesis of lupus nephritis.  
Kidney Blood Press Res 20: 198-200
11. Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Cotran RS, Gimbrone MAJ (1984) Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells.  
J Exp Med 160: 618-623
12. Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Fiers W, Cotran RS, Gimbrone MAJ (1986) Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1.  
Proc Natl Acad Sci U S A 83: 4533-4537
13. Bombeli T, Karsan A, Tait JF, Harlan JM (1997) Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant.  
Blood 89: 2429-2442
14. Bouma BN, Griffin JH (1977) Human blood coagulation factor XI. Purification, properties, and mechanism of activation by activated factor XII.  
J Biol Chem 252: 6432-6437
15. Broze GJJ (1995) Tissue factor pathway inhibitor and the current concept of blood coagulation.  
Blood Coagul Fibrinolysis 6 Suppl 1: S7-13
16. Broze GJJ, Leykam JE, Schwartz BD, Miletich JP (1985) Purification of human brain tissue factor.  
J Biol Chem 260: 10917-10920
17. Brukman J, Wiggins RC (1987) Procoagulant activity in kidneys of normal and bacterial lipopolysaccharide-treated rabbits.  
Kidney Int 32: 31-38
18. Bugge TH, Xiao Q, Kombrinck KW, Flick MJ, Holmback K, Danton MJ, Colbert MC, Witte DP, Fujikawa K, Davie EW, Degen JL (1996) Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation.  
Proc Natl Acad Sci U S A 93: 6258-6263
19. Camerer E, Gjernes E, Wiiger M, Pringle S, Prydz H (2000) Binding of factor VIIa to tissue factor on keratinocytes induces gene expression.  
J Biol Chem 275: 6580-6585

20. Camerer E, Kolsto AB, Prydz H (1996) Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation.  
Thromb Res 81: 1-41
21. Camerer E, Rottingen JA, Gjernes E, Larsen K, Skartlien AH, Iversen JG, Prydz H (1999) Coagulation factors VIIa and Xa induce cell signaling leading to up-regulation of the egr-1 gene.  
J Biol Chem 274: 32225-32233
22. Camerer E, Rottingen JA, Iversen JG, Prydz H (1996) Coagulation factors VII and X induce Ca<sup>2+</sup> oscillations in Madin-Darby canine kidney cells only when proteolytically active.  
J Biol Chem 271: 29034-29042
23. Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Van V, I, Demunck H, Kasper M, Breier G, Evrard P, Muller M, Risau W, Edgington T, Collen D (1996) Role of tissue factor in embryonic blood vessel development.  
Nature 383: 73-75
24. Carson SD (1987) Continuous chromogenic tissue factor assay: comparison to clot-based assays and sensitivity established using pure tissue factor.  
Thromb Res 47: 379-387
25. Carson SD, Henry WM, Shows TB (1985) Tissue factor gene localized to human chromosome 1 (1pter---1p21).  
Science 229: 991-993
26. Clapham DE (1995) Calcium signaling.  
Cell 80: 259-268
27. Conway EM, Bach R, Rosenberg RD, Konigsberg WH (1989) Tumor necrosis factor enhances expression of tissue factor mRNA in endothelial cells.  
Thromb Res 53: 231-241
28. Crossman DC, Carr DP, Tuddenham EG, Pearson JD, McVey JH (1990) The regulation of tissue factor mRNA in human endothelial cells in response to endotoxin or phorbol ester.  
J Biol Chem 265: 9782-9787
29. Cunningham MA, Romas P, Hutchinson P, Holdsworth SR, Tipping PG (1999) Tissue factor and factor VIIa receptor/ligand interactions induce proinflammatory effects in macrophages.  
Blood 94: 3413-3420

30. Daniels DL (1983) in *Lambda-II, Appendix II: Complete Annotated Lambda Sequence*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York
31. Davie EW, Fujikawa K, Kiesel W (1991) The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* 30: 10363-10370
32. Davis RJ, Ganong BR, Bell RM, Czech MP (1985) sn-1,2-Dioctanoylglycerol. A cell-permeable diacylglycerol that mimics phorbol diester action on the epidermal growth factor receptor and mitogenesis. *J Biol Chem* 260: 1562-1566
33. de Prost D, Kanfer A (1985) Quantitative assessment of procoagulant activity in isolated rat glomeruli. *Kidney Int* 28: 566-568
34. Dekker LV, Parker PJ (1994) Protein kinase C – a question of specificity. *Trends Biochem Sci* 19: 73-77
35. Drake TA, Cheng J, Chang A, Taylor FBJ (1993) Expression of tissue factor, thrombomodulin, and E-selectin in baboons with lethal *Escherichia coli* sepsis. *Am J Pathol* 142: 1458-1470
36. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS (1989) Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 134: 1087-1097
37. Drake TA, Ruf W, Morrissey JH, Edgington TS (1989) Functional tissue factor is entirely cell surface expressed on lipopolysaccharide-stimulated human blood monocytes and a constitutively tissue factor-producing neoplastic cell line. *J Cell Biol* 109: 389-395
38. Edgington TS, Mackman N, Brand K, Ruf W (1991) The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb Haemost* 66: 67-79
39. Edgington TS, Mackman N, Fan ST, Ruf W (1992) Cellular immune and cytokine pathways resulting in tissue factor expression and relevance to septic shock. *Nouv Rev Fr Hematol* 34 Suppl: S15-S27
40. Erlich JH, Holdsworth SR, Tipping PG (1997) Tissue factor initiates glomerular fibrin deposition and promotes major histocompatibility complex class II expression in crescentic glomerulonephritis. *Am J Pathol* 150: 873-880

41. Faulk WP, Gargiulo P, McIntyre JA, Bang NU (1989) Hemostasis and fibrinolysis in renal transplantation.  
Semin Thromb Hemost 15: 88-98
42. Fleck RA, Rao LV, Rapaport SI, Varki N (1990) Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody.  
Thromb Res 59: 421-437
43. Furie B, Furie BC (1992) Molecular and cellular biology of blood coagulation.  
N Engl J Med 326: 800-806
44. Gailani D, Broze GJJ (1991) Factor XI activation in a revised model of blood coagulation.  
Science 253: 909-912
45. Gailani D, Broze GJJ (1993) Factor XII-independent activation of factor XI in plasma: effects of sulfatides on tissue factor-induced coagulation.  
Blood 82: 813-819
46. Ganz MB, Saksa B, Saxena R, Hawkins K, Sedor JR (1996) PDGF and IL-1 induce and activate specific protein kinase C isoforms in mesangial cells.  
Am J Physiol 271: F108-F113
47. Gordon LI, Kwaan HC (1999) Thrombotic microangiopathy manifesting as thrombotic thrombocytopenic purpura/hemolytic uremic syndrome in the cancer patient.  
Semin Thromb Hemost 25: 217-221
48. Grandaliano G, Gesualdo L, Ranieri E, Monno R, Schena FP (2000) Tissue factor, plasminogen activator inhibitor-1, and thrombin receptor expression in human crescentic glomerulonephritis.  
Am J Kidney Dis 35: 726-738
49. Grau V, Stehling O, Garn H, Steiniger B (2001) Accumulating monocytes in the vasculature of rat renal allografts: phenotype, cytokine, inducible nitric oxide synthase, and tissue factor mRNA expression.  
Transplantation 71: 37-46
50. Greeno EW, Bach RR, Moldow CF (1996) Apoptosis is associated with increased cell surface tissue factor procoagulant activity.  
Lab Invest 75: 281-289

51. Gregory SA, Morrissey JH, Edgington TS (1989) Regulation of tissue factor gene expression in the monocyte procoagulant response to endotoxin.  
Mol Cell Biol 9: 2752-2755
52. Hancock W, Atkins R (1985) Activation of coagulation pathways and fibrin deposition in human glomerulonephritis.  
Semin Nephrol 5: 69-77
53. Hansen CB, Pyke C, Petersen LC, Rao LV (2001) Tissue factor-mediated endocytosis, recycling, and degradation of factor VIIa by a clathrin-independent mechanism not requiring the cytoplasmic domain of tissue factor.  
Blood 97: 1712-1720
54. Harlos K, Martin DM, O'Brien DP, Jones EY, Stuart DI, Polikarpov I, Miller A, Tuddenham EG, Boys CW (1994) Crystal structure of the extracellular region of human tissue factor.  
Nature 370: 662-666
55. Harrison DJ (1988) Cell death in the diseased glomerulus.  
Histopathology 12: 679-683
56. Hartzell S, Ryder K, Lanahan A, Lau LF, Nathan D (1989) A growth factor-responsive gene of murine BALB/c 3T3 cells encodes a protein homologous to human tissue factor.  
Mol Cell Biol 9: 2567-2573
57. Heidenreich S, Nowak-Gottl U, August C (1999) Hypercoagulable state and graft rejection – is there a link?  
Nephrol Dial Transplant 14: 2293-2296
58. Heidenreich S, Sato T, Schmidt M, August C, Timmerman JJ, van Es LA, Daha MR (1997) Induction of mesangial interleukin-6 synthesis by apoptotic U937 cells and monocytes.  
Kidney Int 52: 318-328
59. Heptinstall RH (1974) Pathology of the Kidney.  
Little, Brown & Co, Boston, 2. Auflage, Seite 376
60. Holdsworth SR, Tipping PG (1985) Macrophage-induced glomerular fibrin deposition in experimental glomerulonephritis in the rabbit.  
J Clin Invest 76: 1367-1374

61. Holschermann H, Bohle RM, Zeller H, Schmidt H, Stahl U, Fink L, Grimm H, Tillmanns H, Haberbosch W (1999) In situ detection of tissue factor within the coronary intima in rat cardiac allograft vasculopathy.  
Am J Pathol 154: 211-220
62. Hughson MD, He Z, Henegar J, McMurray R (2001) Alveolar hemorrhage and renal microangiopathy in systemic lupus erythematosus.  
Arch Pathol Lab Med 125: 475-483
63. Iijima K, Fukuda C, Nakamura K (1991) Measurements of tissue factor-like activity in plasma of patients with DIC.  
Thromb Res 61: 29-38
64. Jiang S, Chow SC, Nicotera P, Orrenius S (1994) Intracellular Ca<sup>2+</sup> signals activate apoptosis in thymocytes: studies using the Ca(2+)-ATPase inhibitor thapsigargin.  
Exp Cell Res 212: 84-92
65. Kakkar AK, DeRuvo N, Chinswangwatanakul V, Tebbutt S, Williamson RC (1995) Extrinsic-pathway activation in cancer with high factor VIIa and tissue factor.  
Lancet 346: 1004-1005
66. Kanfer A (1989) Role of coagulation in glomerular injury.  
Toxicol Lett 46: 83-92
67. Kanfer A, de Prost D, Guettier C, Nochy D, Le F, V, Hinglais N, Druet P (1987) Enhanced glomerular procoagulant activity and fibrin deposition in rats with mercuric chloride-induced autoimmune nephritis.  
Lab Invest 57: 138-143
68. Kincaid-Smith P (1972) Coagulation and renal disease.  
Kidney Int 2: 183-190
69. Knop J, Wesche H, Lang D, Martin MU (1998) Effects of overexpression of IL-1 receptor-associated kinase on NFkappaB activation, IL-2 production and stress-activated protein kinases in the murine T cell line EL4.  
Eur J Immunol 28: 3100-3109
70. Kobayashi E, Nakano H, Morimoto M, Tamaoki T (1989) Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C.  
Biochem Biophys Res Commun 159: 548-553

71. Kodera S, Tashiro K, Ohmuro H, Shirato I, Tomino Y (1997) A case of lupus nephritis showing good clinical course and apoptosis in glomerular cells detected by the nick end labeling method.  
Am J Nephrol 17: 466-470
72. Krishnaswamy S (1992) The interaction of human factor VIIa with tissue factor.  
J Biol Chem 267: 23696-23706
73. Krishnaswamy S, Field KA, Edgington TS, Morrissey JH, Mann KG (1992) Role of the membrane surface in the activation of human coagulation factor X.  
J Biol Chem 267: 26110-26120
74. Kurachi K, Davie EW (1977) Activation of human factor XI (plasma thromboplastin antecedent) by factor XIIIa (activated Hageman factor).  
Biochemistry 16: 5831-5839
75. Lang D, Hubrich A, Dohle F, Terstesse M, Saleh H, Schmidt M, Pauels HG, Heidenreich S (2000) Differential expression of heat shock protein 70 (hsp70) in human monocytes rendered apoptotic by IL-4 or serum deprivation.  
J Leukoc Biol 68: 729-736
76. Lang D, Knop J, Wesche H, Raffetseder U, Kurrle R, Boraschi D, Martin MU (1998) The type II IL-1 receptor interacts with the IL-1 receptor accessory protein: a novel mechanism of regulation of IL-1 responsiveness.  
J Immunol 161: 6871-6877
77. Levi M, ten Cate H, van der Poll T, van Deventer SJ (1993) Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis.  
JAMA 270: 975-979
78. Loeb L (1904) Weitere Untersuchungen über Blutgerinnung.  
Beitr Chem Physiol Pathol 5: 534-557
79. Lwaleed BA (1999) Is tissue factor a mediator of fibrin deposition in glomerular pathology?  
Nephrol Dial Transplant 14: 2533
80. Lwaleed BA, Bass PS, Chisholm M, Francis JL (1997) Urinary tissue factor in glomerulonephritis: a potential marker of glomerular injury?  
J Clin Pathol 50: 336-340
81. Lyberg T (1983) Effect of cyclic AMP and cyclic GMP on thromboplastin (factor III) synthesis in human monocytes in vitro.  
Thromb Haemost 50: 804-809

- 
82. Lyberg T, Galdal KS, Prydz H (1981) Synthesis of Thromboplastin in Endothelial Cells. Second International Symposium on the Biology of the Vascular Endothelial Cell, Cambridge, UK, (Abstract No. 47)
  83. Macfarlane RG (1964) The enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier.  
Nature 202: 498-499
  84. Mackman N, Morrissey JH, Fowler B, Edgington TS (1989) Complete sequence of the human tissue factor gene, a highly regulated cellular receptor that initiates the coagulation protease cascade.  
Biochemistry 28: 1755-1762
  85. Mackman N, Sawdey MS, Keeton MR, Loskutoff DJ (1993) Murine tissue factor gene expression in vivo. Tissue and cell specificity and regulation by lipopolysaccharide.  
Am J Pathol 143: 76-84
  86. Malyszko JS, Malyszko J, Mysliwiec M (1999) Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in kidney allograft recipients.  
Transplant Proc 31: 2118-2120
  87. Marmur JD, Rossikhina M, Guha A, Fyfe B, Friedrich V, Mendlowitz M, Nemerson Y, Taubman MB (1993) Tissue factor is rapidly induced in arterial smooth muscle after balloon injury.  
J Clin Invest 91: 2253-2259
  88. Mehta KS, Halankar AR, Makwana PD, Torane PP, Satija PS, Shah VB (2001) Severe acute renal failure in malaria.  
J Postgrad Med 47: 24-26
  89. Micheau J, Riedel G (1999) Protein kinases: which one is the memory molecule?  
Cell Mol Life Sci 55: 534-548
  90. Moll T, Czyz M, Holzmüller H, Hofer-Warbinek R, Wagner E, Winkler H, Bach FH, Hofer E (1995) Regulation of the tissue factor promoter in endothelial cells. Binding of NF kappa B-, AP-1-, and Sp1-like transcription factors.  
J Biol Chem 270: 3849-3857
  91. Morawitz P (1905) Die Chemie der Blutgerinnung.  
Ergeb Physiol 4: 207-423
  92. Morawitz P (1904) Beiträge zur Kenntnis der Blutgerinnung.  
Beitr Chem Physiol Pathol 5: 133-141

- 
93. Morrissey JH, Fakhrai H, Edgington TS (1987) Molecular cloning of the cDNA for tissue factor, the cellular receptor for the initiation of the coagulation protease cascade.  
Cell 50: 129-135
  94. Naito K, Fujikawa K (1991) Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. Factor XI is activated by thrombin and factor XIa in the presence of negatively charged surfaces.  
J Biol Chem 266: 7353-7358
  95. Napoleone E, Di Santo A, Lorenzet R (1997) Monocytes upregulate endothelial cell expression of tissue factor: a role for cell-cell contact and cross-talk.  
Blood 89: 541-549
  96. Nawroth PP, Stern DM (1986) Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor.  
J Exp Med 163: 740-745
  97. Neale TJ, Tipping PG, Carson SD, Holdsworth SR (1988) Participation of cell-mediated immunity in deposition of fibrin in glomerulonephritis.  
Lancet 2: 421-424
  98. Nemerson Y (1988) Tissue factor and hemostasis.  
Blood 71: 1-8
  99. Nemerson Y (1995) Tissue factor: then and now.  
Thromb Haemost 74: 180-184
  100. O'Neill LA (1992) How does interleukin-1 activate cells?  
Kidney Int 41: 546-549
  101. Ollivier V, Houssaye S, Ternisien C, Leon A, de Verneuil H, Elbim C, Mackman N, Edgington TS, de Prost D (1993) Endotoxin-induced tissue factor messenger RNA in human monocytes is negatively regulated by a cyclic AMP-dependent mechanism.  
Blood 81: 973-979
  102. Ono T, Liu N, Kasuno K, Kusano H, Nogaki F, Kamata T, Suyama K, Muso E, Sasayama S (2001) Coagulation process proceeds on cultured human mesangial cells via expression of factor V.  
Kidney Int 60: 1009-1017
  103. Osterud B (1997) Tissue factor: a complex biological role.  
Thromb Haemost 78: 755-758

- 
104. Peppelenbosch MP, Versteeg HH (2001) Cell biology of tissue factor, an unusual member of the cytokine receptor family.  
Trends Cardiovasc Med 11: 335-339
  105. Petersen LC, Freskgard P, Ezban M (2000) Tissue factor-dependent factor VIIa signaling.  
Trends Cardiovasc Med 10: 47-52
  106. Pettersen KS, Wiiger MT, Narahara N, Andoh K, Gaudernack G, Prydz H (1992) Induction of tissue factor synthesis in human umbilical vein endothelial cells involves protein kinase C.  
Thromb Haemost 67: 473-477
  107. Pickering MC, Botto M, Taylor PR, Lachmann PJ, Walport MJ (2000) Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis.  
Adv Immunol 76: 227-324
  108. Poulsen LK, Jacobsen N, Sorensen BB, Bergenhem NC, Kelly JD, Foster DC, Thastrup O, Ezban M, Petersen LC (1998) Signal transduction via the mitogen-activated protein kinase pathway induced by binding of coagulation factor VIIa to tissue factor.  
J Biol Chem 273: 6228-6232
  109. Proesmans W (2001) The role of coagulation and fibrinolysis in the pathogenesis of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome.  
Semin Thromb Hemost 27: 201-205
  110. Prydz H (2000) A new paradigm for blood coagulation research.  
Thromb Haemost 83: 520, 522
  111. Prydz H, Camerer E, Rottingen JA, Wiiger MT, Gjernes E (1999) Cellular consequences of the initiation of blood coagulation.  
Thromb Haemost 82: 183-192
  112. Rapaport SI (1991) Regulation of the tissue factor pathway.  
Ann N Y Acad Sci 614: 51-62
  113. Rapaport SI, Rao LV (1992) Initiation and regulation of tissue factor-dependent blood coagulation.  
Arterioscler Thromb 12: 1111-1121
  114. Rapaport SI, Rao LV (1995) The tissue factor pathway: how it has become a "prima ballerina".  
Thromb Haemost 74: 7-17

- 
115. Rivers RP, Hathaway WE, Weston WL (1975) The endotoxin-induced coagulant activity of human monocytes.  
Br J Haematol 30: 311-316
  116. Rottingen JA, Enden T, Camerer E, Iversen JG, Prydz H (1995) Binding of human factor VIIa to tissue factor induces cytosolic Ca<sup>2+</sup> signals in J82 cells, transfected COS-1 cells, Madin-Darby canine kidney cells and in human endothelial cells induced to synthesize tissue factor.  
J Biol Chem 270: 4650-4660
  117. Rovin BH, Tan LC (1994) Role of protein kinase pathways in IL-1-induced chemoattractant expression by human mesangial cells.  
Kidney Int 46: 1059-1068
  118. Ruf W, Edgington TS (1994) Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo.  
FASEB J 8: 385-390
  119. Ruf W, Mueller BM (1999) Tissue factor signaling.  
Thromb Haemost 82: 175-182
  120. Saleh H, Schlatter E, Lang D, Pauels HG, Heidenreich S (2000) Regulation of mesangial cell apoptosis and proliferation by intracellular Ca<sup>2+</sup> signals.  
Kidney Int 58: 1876-1884
  121. Scarpati EM, Wen D, Broze GJJ, Miletich JP, Flandermeyer RR, Siegel NR, Sadler JE (1987) Human tissue factor: cDNA sequence and chromosome localization of the gene.  
Biochemistry 26: 5234-5238
  122. Schechter AD, Giesen PL, Taby O, Rosenfield CL, Rossikhina M, Fyfe BS, Kohtz DS, Fallon JT, Nemerson Y, Taubman MB (1997) Tissue factor expression in human arterial smooth muscle cells. TF is present in three cellular pools after growth factor stimulation.  
J Clin Invest 100: 2276-2285
  123. Semeraro N, Colucci M (1992) Changes in the coagulation-fibrinolysis balance of endothelial cells and mononuclear phagocytes: role in disseminated intravascular coagulation associated with infectious diseases.  
Int J Clin Lab Res 21: 214-220
  124. Semeraro N, Colucci M (1997) Tissue factor in health and disease.  
Thromb Haemost 78: 759-764

- 
125. Silva FG, Hoyer JR, Pirani CL (1984) Sequential studies of glomerular crescent formation in rats with antiglomerular basement membrane-induced glomerulonephritis and the role of coagulation factors.  
Lab Invest 51: 404-415
  126. Spicer EK, Horton R, Bloem L, Bach R, Williams KR, Guha A, Kraus J, Lin TC, Nemerson Y, Konigsberg WH (1987) Isolation of cDNA clones coding for human tissue factor: primary structure of the protein and cDNA.  
Proc Natl Acad Sci U S A 84: 5148-5152
  127. Taylor FBJ, Chang A, Ruf W, Morrissey JH, Hinshaw L, Catlett R, Blick K, Edgington TS (1991) Lethal *E. coli* septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody.  
Circ Shock 33: 127-134
  128. Terry CM, Callahan KS (1996) Protein kinase C regulates cytokine-induced tissue factor transcription and procoagulant activity in human endothelial cells.  
J Lab Clin Med 127: 81-93
  129. Tipping PG, Dowling JP, Holdsworth SR (1988) Glomerular procoagulant activity in human proliferative glomerulonephritis.  
J Clin Invest 81: 119-125
  130. Tipping PG, Erlich JH, Apostolopoulos J, Mackman N, Loskutoff D, Holdsworth SR (1995) Glomerular tissue factor expression in crescentic glomerulonephritis. Correlations between antigen, activity, and mRNA.  
Am J Pathol 147: 1736-1748
  131. Tipping PG, Leong TW, Holdsworth SR (1991) Tumor necrosis factor production by glomerular macrophages in anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in rabbits.  
Lab Invest 65: 272-279
  132. Tipping PG, Lowe MG, Holdsworth SR (1988) Glomerular macrophages express augmented procoagulant activity in experimental fibrin-related glomerulonephritis in rabbits.  
J Clin Invest 82: 1253-1259
  133. Tipping PG, Lowe MG, Holdsworth SR (1991) Glomerular interleukin 1 production is dependent on macrophage infiltration in anti-GBM glomerulonephritis.  
Kidney Int 39: 103-110

134. Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM, Stanton JJ, Broze GJJ (1996) Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood* 88: 1583-1587
135. Vassalli P, McCluskey RT (1971) The pathogenetic role of the coagulation process in glomerular diseases of immunologic origin. *Adv Nephrol Necker Hosp* 1: 47-63
136. Wada H, Nakase T, Nakaya R, Minamikawa K, Wakita Y, Kaneko T, Ohiwa M, Deguchi K, Shirakawa S (1994) Elevated plasma tissue factor antigen level in patients with disseminated intravascular coagulation. *Am J Hematol* 45: 232-236
137. Warr TA, Rao LV, Rapaport SI (1990) Disseminated intravascular coagulation in rabbits induced by administration of endotoxin or tissue factor: effect of anti-tissue factor antibodies and measurement of plasma extrinsic pathway inhibitor activity. *Blood* 75: 1481-1489
138. Watanabe T, Yasuda M, Yamamoto T (1999) Angiogenesis induced by tissue factor in vitro and in vivo. *Thromb Res* 96: 183-189
139. Wiggins RC, Njoku N, Sedor JR (1990) Tissue factor production by cultured rat mesangial cells. Stimulation by TNF alpha and lipopolysaccharide. *Kidney Int* 37: 1281-1285
140. Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D (1989) Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 2839-2843
141. Xuereb JM, Sie P, Boneu B, Constans J (1997) Up-regulation of tissue factor expression by platelet-derived growth factor in human vascular smooth muscle cells in culture – role of mitogen-activated protein kinase and effects of intracellular cyclic AMP. *Thromb Haemost* 78: 1520-1526
142. Yamabe H, Osawa H, Inuma H, Kaizuka M, Tamura N, Tsunoda S, Fujita Y, Shirato K, Onodera K (1996) Tissue factor pathway inhibitor production by human mesangial cells in culture. *Thromb Haemost* 76: 215-219
143. Yamamoto K, Loskutoff DJ, Saito H (1998) Renal expression of fibrinolytic genes and tissue factor in a murine model of renal disease as a function of age. *Semin Thromb Hemost* 24: 261-268

- 
144. Yokoo T, Kitamura M (1996) Dual regulation of IL-1 beta-mediated matrix metalloproteinase-9 expression in mesangial cells by NF-kappa B and AP-1. *Am J Physiol* 270: F123-F130
  145. Yokoo T, Kitamura M (1996) Opposite, binary regulatory pathways involved in IL-1-mediated stromelysin gene expression in rat mesangial cells. *Kidney Int* 50: 894-901

## **6. Curriculum vitae**

Martin Terstesse  
Im Lichtenfelde 88  
33100 Paderborn

[martin@terstesse.de]

Geburt: 1. Dezember 1974 in Paderborn  
Eltern: Klaus Terstesse, Volksschulrektor i. R.  
Hildegard Terstesse, geb. Hommens, Lehrerin  
Konfession: römisch-katholisch  
Familienstand: verheiratet seit 1999 mit Delia Terstesse, geb. Schnitzmeier

### **Schulbildung:**

1981 – 1985 Kilian-Grundschule, Paderborn  
1985 – 1994 Reismann-Gymnasium, Paderborn  
05/1994 Allgemeine Hochschulreife

### **Zivildienst:**

08/1994 – 10/1995 Johanniter-Unfall-Hilfe Paderborn (Rettungssanitäter)

### **Hochschulstudium:**

10/1995 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der  
Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster  
09/1997 Ärztliche Vorprüfung  
09/1998 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
04/2001 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
04/2001– 04/2002 Praktisches Jahr im Brüderkrankenhaus St. Josef,  
Paderborn (Wahlfach Anästhesie)  
04/2002 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
05/2002 Vorläufige Approbation

### **Berufstätigkeit:**

seit 01.06.2002 Arzt im Praktikum in der Anästhesie-Abteilung des  
Brüderkrankenhauses St. Josef, Paderborn

Paderborn, 1. Juli 2002

## **7. Danksagung**

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Stefan Heidenreich für die Überlassung des Dissertationsthemas und meinem Betreuer Dr. Detlef Lang für sein Engagement. Durch ihre motivierende Betreuung und stete Gesprächsbereitschaft war es mir möglich, diese Arbeit voranzutreiben und zu vollenden.

Des Weiteren möchte ich meinen Eltern danken, die mein Studium ermöglicht und getragen haben. Ein ganz herzlicher Dank gilt vor allem meiner Frau, da ohne ihr interessiertes Zuhören und ihre vielfältige Rücksichtnahme diese Arbeit nicht hätte gelingen können.