

Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen des
Deutschen Herzzentrums München der
Technischen Universität München

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

**Charakterisierung der proinflammatorischen Effekte der
Gerinnungsfaktoren Xa und VIIa
und ihre Bedeutung beim akuten Myokardinfarkt**

Gabriele J. M. Busch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. I. Ott

2. Univ.-Prof. A. Kastrati

Die Dissertation wurde am 07.12.2004 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.05.2005 angenommen.

Inhalt

1	Einleitung	4
1.1	Bedeutung der Inflammation beim akuten Myokardinfarkt	4
1.2	Zusammenhang zwischen Koagulation und Inflammation	5
1.2.1	Gerinnungskaskade	5
1.2.2	Tissue factor.....	7
1.2.3	Tissue factor pathway inhibitor.....	8
1.2.4	Protease-aktivierte Rezeptoren.....	9
1.3	Fragestellung.....	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Patientenauswahl.....	13
2.2	Immunoassays	14
2.3	Präparation und Stimulation von Endothel- und mononukleären Zellen.....	14
2.4	Durchflusszytometrie.....	16
2.5	RNA-Isolierung und Real-time PCR	16
2.5.1	Prinzip der Real-time PCR	16
2.5.2	Versuchsdurchführung	20
2.6	Weitere Methoden	22
2.7	Statistische Auswertung	22
3	Ergebnisse	24
3.1	Zytokine und Gerinnungsaktivierung in vivo	24
3.1.1	Klinische Charakteristika der Patientengruppen.....	24
3.1.2	Plasmakonzentrationen von TFPI-Xa, F1+2, IL-8 und IL-6	25
3.2	Zytokine und Gerinnungsaktivierung in vitro	28
3.2.1	Dosis-Wirkungskurven und Zeitabhängigkeit	29
3.2.2	Spezifität	31
3.2.3	Endothelzellen.....	31
3.2.4	Mononukleäre Zellen.....	33
3.2.5	Gerinnungsfaktor VIIa	35
3.2.6	Protease-aktivierte Rezeptoren.....	36

4	Diskussion	40
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	40
4.2	Zusammenhang zwischen erhöhten TFPI-Xa-Spiegeln und zirkulierenden inflammatorischen Zytokinen beim akuten Myokardinfarkt.....	40
4.3	Bedeutung von FXa und FVIIa und Rolle der Protease-aktivierten Rezeptoren.....	42
4.4	Spezifität	43
4.5	Interleukin-6	44
5	Zusammenfassung.....	45
6	Verzeichnisse	46
6.1	Abkürzungen	46
6.2	Abbildungen	48
6.3	Tabellen	50
6.4	Literatur	51
7	Danksagung.....	62

1 Einleitung

1.1 *Bedeutung der Inflammation beim akuten Myokardinfarkt*

Der akute Herzinfarkt zählt in den Industrienationen zu den häufigsten Todesursachen und stellt auch wirtschaftlich eine der folgenschwersten Erkrankungen dar: Im Jahr 2002 starben in der Bundesrepublik Deutschland 841 686 Menschen, davon 393 778 an Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems⁶³. Mit 7,6% der Sterbefälle war dabei der akute Myokardinfarkt nach der chronisch ischämischen Herzkrankheit für den zweitgrößten Anteil der Todesursachen verantwortlich. Hochgerechnet auf die Lebenserwartung führten die Herz-Kreislauf-Erkrankungen im Jahr 2002 in Deutschland zu 3,4 Millionen verlorenen Lebensjahren. Die Kosten, die dem Gesundheitswesen durch diese Krankheitsgruppe im selben Jahr entstanden, betrugen insgesamt über 35 Milliarden Euro. Diese Zahlen machen deutlich, wie wichtig für den Betroffenen, aber darüber hinaus auch im volkswirtschaftlichen Sinn eine umfassende Prävention zur Verbesserung der Prognose ischämischer Herzerkrankungen ist. Für dieses Ziel sind ein besseres Verständnis der Pathogenese der koronaren Herzkrankheit und das Erkennen von Risikogruppen nötig.

Im Bemühen um das Verständnis der Pathophysiologie des akuten Myokardinfarkts (AMI) wurde dem Faktor Entzündung in den letzten Jahren immer mehr Bedeutung beigemessen⁶¹. Als laborchemische Zeichen einer Entzündung dienen beispielsweise die Zytokine Interleukin (IL)-6, IL-8, Monozyten chemotaktisches Protein (MCP)-1 sowie das akute Phase Protein C-reaktives Protein (CRP). Nicht nur sind diese Parameter im Blut von Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS) erhöht^{5, 9, 43}, sie haben auch prognostische Relevanz für das Risiko eines zukünftigen kardiovaskulären Ereignisses^{7, 8, 15, 16, 27, 32, 37}, und die langfristige Mortalität der Patienten^{35, 36, 46}.

Darüberhinaus besitzen diese Entzündungszeichen auch bei offensichtlich gesunden Personen eine Aussagekraft über das Risiko, in Zukunft einen Herzinfarkt zu erleiden^{57, 58, 59}.

Natürlich ist das Auffinden von unabhängigen Risikofaktoren noch kein Beweis für einen kausalen Zusammenhang. Doch es gibt auch experimentellen Studien, die den Einfluss von systemischen Entzündungsreaktionen für das Ausmaß des defekten

Myokards und damit die Prognose bestätigen. Erhöht man beispielsweise durch subkutane Crotonölinjektion CRP-Spiegel bei Kaninchen, so kommt es zu einer Vergrößerung der Infarktausdehnung nach 10minütiger Ischämie und 180minütiger Reperfusion⁶.

Auf ähnliche Weise zeigten auch klinische Studien, dass die Höhe des CRP-Spiegels bei Patienten mit akutem Herzinfarkt zum Anteil des geschädigten Herzmuskels, der durch Reperfusion gerettet werden kann, indirekt proportional ist¹⁸.

1.2 Zusammenhang zwischen Koagulation und Inflammation

Neben erhöhten Entzündungszeichen gibt es noch weitere Parameter für eine schlechte Prognose bei akutem Herzinfarkt, so z. B. eine Aktivierung der Gerinnungskaskade.

Erhöhte Spiegel an Prothrombinfragment F1+2²¹, Fibrinopeptid A³ bzw. D-Dimer⁴⁷ spiegeln einen prokoagulatorischen Zustand wider und sind assoziiert mit einem ungünstigen Verlauf bei instabiler Angina pectoris bzw. nach akutem Myokardinfarkt. Da der Herzinfarkt in der Regel ein thrombotisches Geschehen ist, ist die Frage von besonderer Bedeutung, ob die Koagulationsaktivierung als solche einen Effekt auf die Pathophysiologie und die Auswirkungen eines akuten Myokardinfarkts hat.

1.2.1 Gerinnungskaskade

Auch wenn eine strikte Trennung zwischen extrinsischer und intrinsischer Gerinnung der Physiologie nicht immer gerecht wird, spielt in diesem Zusammenhang der extrinsische Weg der Gerinnungskaskade eine entscheidende Rolle. Er ist in der Abbildung 1 dargestellt.

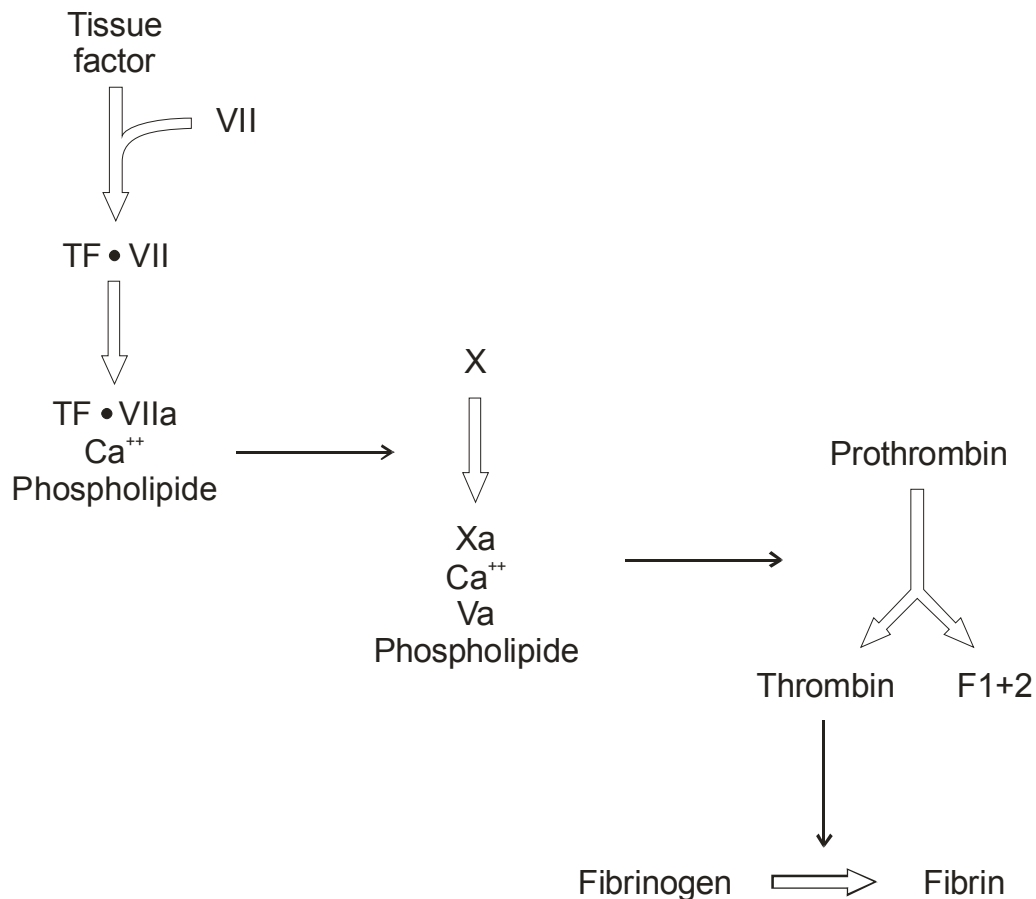


Abbildung 1: Extrinsische Gerinnungskaskade

Die Blutgerinnungsfaktoren Thrombin, Faktor VII und Faktor X liegen im Plasma in inaktiver Form als Zymogene vor. Durch proteolytische Spaltung werden sie zu Serinproteasen aktiviert.

Die extrinsische Gerinnungskaskade wird durch eine Komplexbildung zwischen Tissue factor (TF) und Faktor VII initiiert. Der dadurch entstehende Faktor VIIa aktiviert im Komplex mit TF und in Anwesenheit von ionisiertem Kalzium und Phospholipiden Faktor X zu Faktor Xa. Dieser bildet zusammen mit Kalziumionen, Faktor Va und Phospholipiden die sogenannte Prothrombinase, die Prothrombin zu Thrombin aktiviert. Bei diesem Schritt wird das Prothrombinfragment F1+2 abgespalten. Thrombin katalysiert anschließend die Bildung von Fibrin, dessen Polymerisierung zu einem Thrombus als dreidimensionales Maschenwerk aus Fibrinfäden, Zellen und Thrombozyten führt.

1.2.2 Tissue factor

Der wichtigste Initiator der extrinsischen Gerinnungskaskade ist das transmembranöse Glykoprotein Tissue factor (TF), der Rezeptor und Kofaktor für den Gerinnungsfaktor VII / VIIa. Unter physiologischen Bedingungen wird TF hauptsächlich extravaskulär exprimiert. Nach Gefäßwandverletzung kommt es so zum Kontakt zwischen TF und dem plasmatischen Gerinnungsfaktor VII / VIIa, wodurch die extrinsische Gerinnungskaskade initiiert und – physiologisch sinnvoll – die Blutung aus dem verletzten Gefäß terminiert wird.

Beim akuten Myokardinfarkt allerdings führt die Ruptur von atherosklerotischen Plaques zu einer Freilegung von TF-positiven Zellen aus dem Plaque gegenüber den Gerinnungsfaktoren des Plasmas und initiiert eine lokale Thrombose, die daraufhin zum Verschluss des Koronargefäßes führt ^{45, 67}.

Die Synthese von TF und damit auch seine Lokalisation wird jedoch von verschiedenen Einflussgrößen moduliert.

Mehrere Entzündungsmediatoren wie z.B. IL-6, IL-8 und MCP-1 induzieren die TF-Expression von Monozyten ^{39, 48}. Auch im akuten Koronarsyndrom tritt eine gesteigerte TF-Expression auf zirkulierenden Monozyten und Mikropartikeln auf und kann dadurch zu einer Gerinnungsaktivierung beitragen ^{40, 53, 54}. Ebenso wurde eine lösliche, gespaltete Variante von TF im zirkulierenden Blut gefunden, die die koronare Thrombose fördern könnte ¹¹. Doch nicht nur am Ort des Plaques kommt es zu einer Stimulation der TF-Thrombin-Kaskade, sondern auch innerhalb des ischämischen Myokards. Im Kaninchenmodell konnte gezeigt werden, dass bei der Ligatur von Koronargefäßen die TF-Expression im betroffenen Myokard gesteigert ist ²⁰. Eine Thrombininhibition reduziert hierbei sowohl Infarktgröße als auch die Entzündungsreaktion in Form von Chemokinexpression und Leukozyteninfiltration. Anders ausgedrückt steigern aktivierte Gerinnungsfaktoren die Entzündungsreaktion und können somit die Infarktgröße ausdehnen ²⁰.

1.2.3 Tissue factor pathway inhibitor

Tissue Factor Pathway Inhibitor-1 (TFPI) hemmt die Initiierung der TF-induzierten Blutgerinnung⁴⁵. Der endogene Proteaseinhibitor TFPI besteht aus drei sogenannten Kunitz-Domänen (K1 - K3, Abb. 2). Mit der zweiten Domäne bindet TFPI an das aktive Zentrum des Gerinnungsfaktors Xa (FXa) und inhibiert dadurch seine proteolytische Aktivität. Anschließend bindet der TFPI-FXa Komplex über die erste Domäne des TFPI den Gerinnungsfaktor VIIa (FVIIa) – sofern dieser an TF gebunden ist – und inaktiviert ihn durch Bildung des tetramolekularen Komplexes TF-FVIIa-TFPI-FXa. Über die Funktion der dritten Kunitz-Domäne bestehen bisher keine Erkenntnisse.

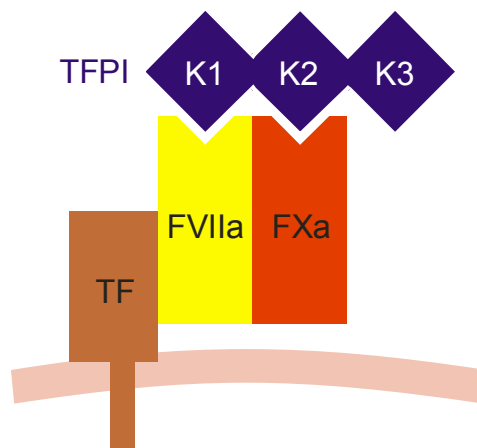


Abbildung 2: Schema des Tissue factor pathway inhibitors

In dieser Arbeit wurde die Eigenschaft von TFPI genutzt, FXa zu binden, um indirekt FXa-Spiegel im Blut von Patienten zu messen. Grundlage für diese Methode sind Publikationen, in denen gezeigt werden konnte, dass erhöhte Konzentrationen des TFPI-FXa Komplexes sowohl eine vermehrte FXa-Bildung als auch erhöhte TFPI-Konzentrationen widerspiegeln können^{31, 51} und mit einer gesteigerten Gerinnungsaktivierung assoziiert sind⁵².

1.2.4 Protease-aktivierte Rezeptoren

Ein wichtiger Baustein beim Zusammenspiel von Gerinnung und Inflammation sind die sogenannten Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR). Dies sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die verschiedene zelluläre Reaktionen wie Zytokinfreisetzung, Expression von Adhäsionsmolekülen, Zellmigration oder -proliferation vermitteln können.

Im Gegensatz zu anderen Rezeptoren werden sie nicht durch einen löslichen, externen Liganden aktiviert, sondern durch Proteasen¹⁷, wie dies auch Gerinnungsfaktoren sind. Die Proteasen spalten ein Stück des extrazellulären Teils am NH₂-Ende des Rezeptors ab⁵⁶ (Abb. 3 A), wodurch es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors kommt und er sich durch den sogenannten gebundenen Liganden („tethered ligand“) selbst aktiviert (Abb. 3 B). Dieser aktivierende Teil ist nur sechs Aminosäuren lang⁶⁵. In Experimenten kann der Protease-aktivierte Rezeptor deshalb auch statt durch Proteasen mit Hilfe von Peptiden mit der stimulierenden Aminosäuresequenz aktiviert werden (Abb. 3 C).

Anders als bei löslichen Liganden ist die Aktivierung durch die enzymatische Spaltung irreversibel. Nach der proteolytischen Aktivierung muss der Rezeptor daher internalisiert, degradiert und neu synthetisiert werden.

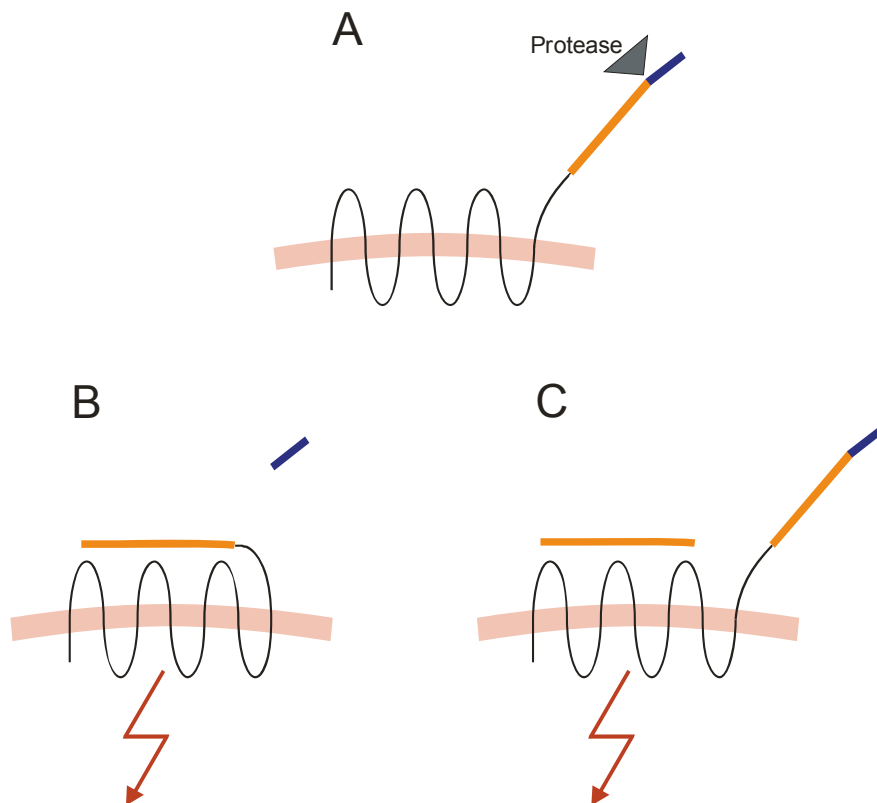


Abbildung 3: Schema der Protease-aktivierten Rezeptoren

Bisher sind vier verschiedene Protease-aktivierte Rezeptoren bekannt, die durch unterschiedliche Proteasen aktiviert werden. Tabelle 1 zeigt Beispiele einiger der wichtigsten Lokalisationen, Wirkungen und Aktivatoren dieser vier Rezeptoren ³⁸.

Tabelle 1: Beispiele von Expressionsort, Effekt und Aktivatoren der Protease-aktivierten Rezeptoren

	Expressionsort	Effekt	Aktivierende Proteasen und Peptide
PAR-1	Thrombozyten	Aggregation	Thrombin, FXa SFLLRN (Aminosäuresequenz)
	Vaskuläre glatte Muskelzellen	Mitogenese	
	Endothelzellen	Permeabilitätssteigerung	
	Monozyten	Aktivierung	
	Neuronale Zellen, Fibro- und Osteoblasten	Proliferation	

	Expressionsort	Effekt	Aktivierende Proteasen und Peptide
PAR-2	Bronchiale glatte Muskelzellen	Proliferation	Mastzelltryptase, Trypsin, FXa, FVIIa SLIGKV (Aminosäuresequenz)
	Enterozyten	Intrazell. Ca ⁺⁺ -Anstieg	
	Pankreatozyten	Pankreassaftsekretion	
	Keratinocyten	Aufnahme von Melanin	
PAR-3	Herz, Gehirn, Dünndarm, Knochenmark	Präsentation von Thrombin für PAR-4 ?	Thrombin
PAR-4	Thrombozyten	Aggregation	Thrombin, Trypsin, Cathepsin G
	Lunge, Pankreas, Schilddrüse	Intrazell. Ca ⁺⁺ -Anstieg	

In Bezug auf die Gerinnungsfaktoren, die für die vorliegende Arbeit relevant sind, bedeutet dies:

- Die Signaltransduktion von FXa wird über PAR-1 und PAR-2 vermittelt, wie genetische Studien und Experimente zur Rezeptordesensitivierung zeigten ^{13, 60}.
- Für die zellulären Effekte von Thrombin sind PAR-1, PAR-3 und PAR-4 verantwortlich ⁵⁵.
- FVIIa dagegen scheint hauptsächlich über den Rezeptor PAR-2 zu wirken ¹², der offensichtlich durch Thrombin nicht aktiviert wird ⁵⁵.

1.3 Fragestellung

Die Interaktionen zwischen Koagulation und Inflammation sind komplex und bisher unzureichend erforscht. Diese Arbeit soll zum Verständnis dieser Zusammenhänge beitragen.

Nach ihrer Aktivierung beeinflussen sich Entzündung und Gerinnung gegenseitig. Einerseits induzieren Entzündungsmediatoren die TF-Expression auf der Oberfläche von zirkulierenden Monozyten und möglicherweise auch Endothelzellen³⁹. Auf der anderen Seite können Serinproteasen wie z.B. Gerinnungsfaktoren Protease-aktivierte Rezeptoren auf der Oberfläche der Monozyten und Endothelzellen aktivieren und so zu einer zusätzlichen Entzündungsreaktion führen³⁸.

Mittlerweile ist unumstritten, dass

- sich erstens im akuten Myokardinfarkt eine Entzündung abspielt, und
- zweitens die Prognose durch das Ausmaß dieser Entzündung entscheidend beeinflusst wird.

Über die Rolle der Gerinnungsaktivierung bei diesen Entzündungsreaktionen bestehen hingegen bisher wenige Erkenntnisse.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Beziehung zwischen Aktivierung der Gerinnungskaskade und systemischer Entzündung im akuten Herzinfarkt zu untersuchen und den zugrundeliegenden Mechanismus in vitro zu erforschen.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenauswahl

Um den Zusammenhang zwischen einer Gerinnungsaktivierung und der nachfolgenden systemischen Entzündung im akuten Herzinfarkt zu analysieren, wurde Blut einer Gruppe von Patienten mit akutem Myokardinfarkt und einer Kontrollgruppe untersucht.

21 Patienten mit akutem Herzinfarkt ohne vorausgegangene instabile Angina pectoris bildeten die Infarktgruppe. Ausschlaggebend für die Diagnose waren folgende Kriterien:

- Mehr als 30 Minuten dauernder Brustschmerz
- Signifikante ST-Streckenhebungen (mindestens 1 mm in mindestens 2 aufeinanderfolgenden Ableitungen)
- Das Enzym Creatinkinase (CK) wurde im Verlauf beobachtet und musste auf über das Dreifache der Norm ansteigen.

Als Kontrollgruppe dienten 20 Patienten mit stabiler Angina pectoris, die sich einer elektiven Koronarangioplastie mit Stentimplantation unterzogen.

Die Ausschlusskriterien bei der Patientenauswahl umfassten nicht-kardiale entzündliche oder maligne Erkrankungen. Die Studie wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Technischen Universität München genehmigt. Von allen Patienten wurde das schriftliche Einverständnis eingeholt.

Die periinterventionelle Therapie beider Gruppen beinhaltete Abciximab (0,25 mg / kg Körpergewicht als Bolus und eine anschließende kontinuierliche Infusion von 0,125 µg / kg Körpergewicht / min für 12 Stunden), Heparin (7500 IE) und 500 mg Acetylsalicylsäure i.v.. Postinterventionell erhielten die Patienten 2 x / Tag 250 mg Ticlopidin für die Dauer von 4 Wochen und 2 x / Tag 100 mg Acetylsalicylsäure auf unbefristete Zeit.

Unmittelbar vor der Intervention sowie 24, 48 und 96 Stunden danach wurde den Patienten peripher venöses Blut abgenommen. Die gewonnene Probe wurde auf Eis gelegt und ohne Verzögerung weiterverarbeitet.

2.2 Immunoassays

Die Konzentrationen von TFPI-Xa, F1+2, IL-6, IL-8 und MCP-1 wurden mittels Immunoassays gemessen (Imubind[®] TFPI-Xa, American Diagnostica, Pfungstätt; Enzygnost[®] F1+2 micro Behring Diagnostica, Marburg; IL-6, IL-8 und MCP-1 Quantikine[®], R&D Systems, Minneapolis, MO, USA).

Dabei wird das Zielmolekül über einen spezifischen Antikörper auf einer Mikroplatte immobilisiert und im Sandwichverfahren mit einem zweiten enzymgebundenen Antikörper markiert. In einem anschließenden Schritt erfolgt eine Farbreaktion, deren Intensität photometrisch bestimmt wird und die proportional zur gebundenen Enzymmenge und damit zur Konzentration der zu untersuchenden Substanz ist.

Der untere Schwellenwert betrug 0,02 nmol/l für TFPI-Xa, 0,02 nmol/l für F1+2, 0,7 pg/ml für IL-6, 10 pg/ml für IL-8 und 5 pg/ml für MCP-1. Die Variabilität im unteren Messbereich innerhalb eines Assays belief sich dabei auf unter 10%.

2.3 Präparation und Stimulation von Endothel- und mononukleären Zellen

Endothelzellen von humanen Umbilikalvenen (human umbilical veins endothelial cells, HUVEC-c, PromoCell, Heidelberg) wurden in Zellkulturflaschen mit CELL+ Wachstumsfläche (Sarstedt, Nümbrecht) bei 37°C und 5% CO₂ in Endothelial Cell Growth Medium (PromoCell) kultiviert, dem fötales bovines Serum (FBS, Biochrom, Berlin) zu einer Endkonzentration von 10% hinzugefügt wurde. Zum Passagieren der Zellen wurde der Detach Kit von PromoCell verwendet.

Vor der Stimulation wurden HUVEC der Passagen 4 - 6 bei 90% Konfluenz je nach Versuch in Zellkulturflaschen oder gelatinebeschichteten multiple-wells-Platten zunächst mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, Sigma, Deisenhofen) gewaschen, 3 Stunden mit serumfreiem Medium vorinkubiert und anschließend die Stimulation durchgeführt. Nach Ablauf der Zeit wurden die Überstände abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Die Endothelzellen wurden mit Hilfe von Trypsin aus dem Detach Kit (PromoCell) von der Wachstumsfläche gelöst und wie unten beschrieben für die Durchflusszytometrie oder RNA-Isolierung aufbereitet.

Mononukleäre Zellen von gesunden Spendern wurden mit der Dichtegradientenmethode isoliert ⁶⁶. 2 mal 20 ml venöses Vollblut wurde unter sterilen Bedingungen in Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Röhrchen abgenommen und ohne Vermischung auf die gleiche Menge Ficoll-Paque™ Plus (Amersham Biosciences, Freiburg) geschichtet. Nach 30minütiger Zentrifugation bei 2100 Umdrehungen pro Minute bildet sich eine Interphase mit mononukleären Zellen zwischen den unten gelegenen Erythrozyten und Granulozyten und dem oben gelegenen Serum:

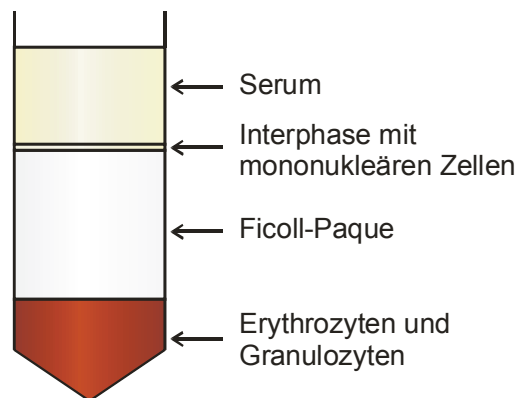


Abbildung 4: Monozytenisolierung durch einen Dichtegradienten

Diese Interphase wurde abpipettiert und drei mal mit PBS (Sigma) gewaschen. Anschließend wurden die mononukleären Zellen in serumfreiem RPMI 1640 Medium (Biochrom) resuspendiert, mit dem Zellzählautomaten KX-21N (Sysmex, Norderstedt) gezählt und sofort im Anschluss stimuliert. Danach erfolgte eine Zentrifugation mit 2000 Umdrehungen pro Minute, so dass die Überstände abgenommen werden konnten. Die Verwendung der Überstände und die weitere Behandlung der mononukleären Zellen (RNA-Isolierung oder Färbung für die Durchflusszytometrie) wurde analog zu den Endothelzellen durchgeführt.

Die Stimulation der Endothel- und mononukleären Zellen erfolgte mit FXa (American Diagnostica), rekombinantem FVIIa (NovoSeven®, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dänemark), oder den synthetischen Peptiden SFLLRN und SLIGKV (Bachem, Heidelberg), deren Bezeichnungen ihre Aminosäuresequenzen wiedergeben. Die stimulierenden Substanzen wurden jeweils in serumfreiem Medium gelöst und zu den Zellen gegeben, die Stimulation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂.

Zunächst wurden in Vorversuchen die Zeit- und Dosisabhängigkeit der Stimulationen auf die Zytokinfreisetzung untersucht. Dazu wurden HUVEC mit unterschiedlichen Konzentrationen und über verschiedene Zeiträume stimuliert, anschließend mikroskopisch auf gleiche Zelldichte untersucht und die freigesetzten Zytokine in den Überständen mit Immunoassays gemessen.

Für die Inhibitionsversuche wurden HUVEC eine Stunde vor Zugabe von FXa präinkubiert mit 1 $\mu\text{mol/ml}$ des am aktiven Zentrum wirkenden, Antithrombin III-unabhängigen FXa-Inhibitor MC53255 (Morphochem, München), 100 nmol/l des Thrombininhibitors Lepirudin (Refludan[®], Pharmion, Hamburg), 10 $\mu\text{g/ml}$ des monoklonalen anti-PAR-1 Antikörpers ATAP2 (Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA) oder 10 $\mu\text{mol/l}$ des PAR-2 inhibierenden Peptids YFLLRNP (Bachem, Heidelberg).

2.4 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie wurden die Endothelzellen im Anschluss an die Stimulation auf die Oberflächenantigendichte von CD 54 (Intercellular Adhesion Molecule oder ICAM-1) untersucht. Dazu wurden die Zellen nach Abnahme der Überstände mit Trypsin aus dem Detach Kit (PromoCell) von der Wachstumsoberfläche gelöst. Die Färbungen für die Durchflusszytometrie erfolgten mit Phycoerythrin (PE)-markiertem anti-CD54 Antikörper (Immunotech, Marseille, Frankreich), die Messungen wurden am Gerät FACSCalibur[™] (Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg) durchgeführt.

2.5 RNA-Isolierung und Real-time PCR

2.5.1 Prinzip der Real-time PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein sehr sensitives Verfahren, um Genexpression zu analysieren und kann im Idealfall einzelne DNA-Moleküle amplifizieren. Durch die Kombination von reverser Transkription von RNA in DNA und anschließender PCR (sogenannte RT-PCR) ist auch der Nachweis von RNA mit sehr viel größerer Sensitivität möglich als mit den traditionellen Blotting-Methoden.

Allerdings sind quantitative Aussagen nur in eingeschränktem Maß zu treffen. Da die PCR per Definition eine Kettenreaktion ist, steigt die Menge der produzierten Moleküle zunächst exponentiell an. Durch diesen Anstieg einerseits und sinkende Konzentrationen der Substrate andererseits nimmt die Produktion neuer Moleküle nach einer gewissen Anzahl von Zyklen ab und erreicht schließlich ein Plateau. Dabei unterscheidet sich jedoch diese Anzahl von Zyklen je nach Sequenz und Menge der eingesetzten RNA, wodurch ein linearer Zusammenhang zwischen der Zahl der eingesetzten und der amplifizierten Moleküle, und damit exakte quantitative Aussagen erschwert werden.

Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgt in dieser Arbeit durch Detektion eines fluoreszierenden Signals, das proportional zu ihrer Menge ist. Diese Fluoreszenz wird „real time“ während jedes Zyklus in jedem einzelnen Feld der 96-well Platte gemessen. Das Prinzip der Real-time PCR beruht auf einer für die zu amplifizierende Sequenz spezifischen Sonde („probe“), die zwei Farbstoffe enthält: den „reporter“ am 5' und den „quencher“ am 3' Ende, das außerdem blockiert ist, um eine Extension der Sonde während der PCR zu verhindern.

Ist die Sonde intakt, so unterdrückt die Nähe des quenchers die Fluoreszenz des reporters durch eine zwischenmolekulare Energieübertragung nach Förster ²² (s. Abb. 5 A). Im Laufe der Polymerisation spaltet die Taq-Polymerase aufgrund ihrer Nukleaseaktivität die Sonde zwischen reporter und quencher genau dann, wenn diese mit einem DNA-Strang hybridisiert ²⁹ (s. Abb. 5 B). Die Fragmente lösen sich und die Polymerisation wird fortgesetzt, ohne dass die exponentielle Vervielfältigung beeinträchtigt wird (s. Abb. 5 C). Die Trennung von reporter und quencher bewirkt einen Anstieg des Fluoreszenzsignals des reporters, das in jedem Zyklus gemessen wird. Dieser Anstieg tritt nur dann ein, wenn erstens die Zielsequenz komplementär zur Sonde ist und zweitens während der PCR amplifiziert wird.

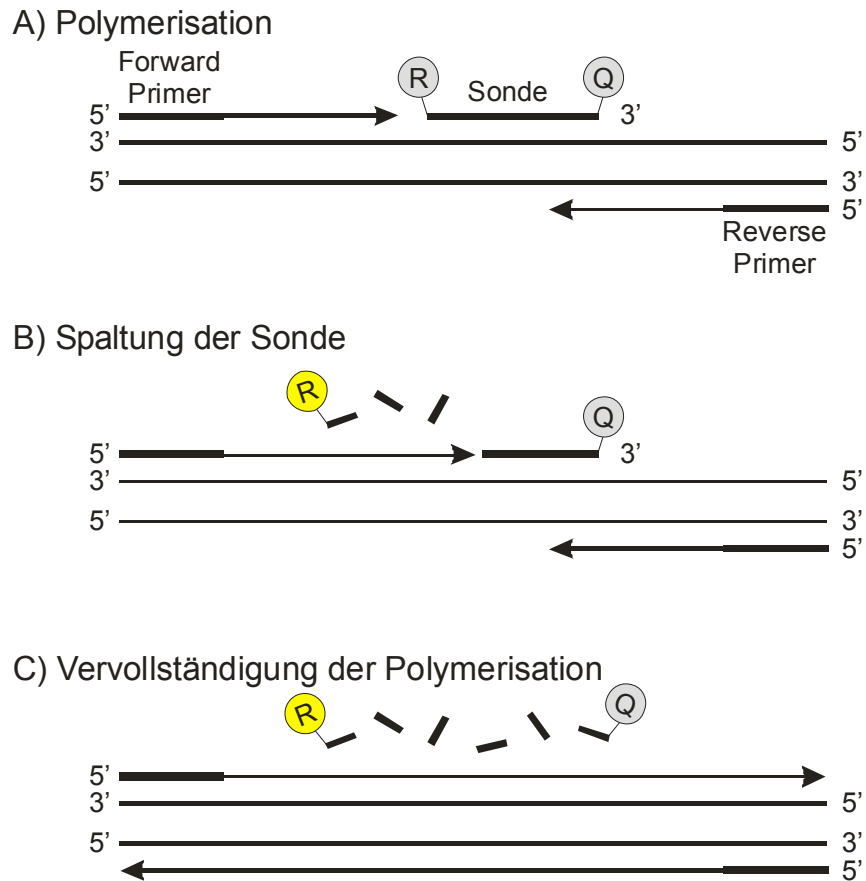


Abbildung 5: Prinzip der Real-time PCR

Die Fluoreszenzstärke der Felder wird in jedem Zyklus gemessen und zeigt typischerweise einen sigmoidalen Kurvenverlauf:

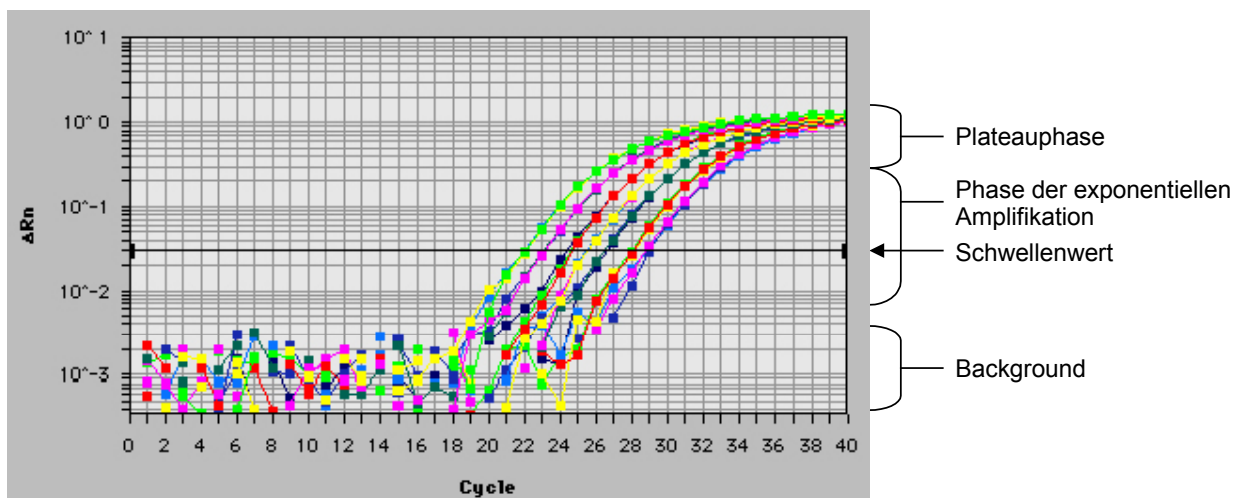


Abbildung 6: Beispiel einer Real-time PCR Messung

Nach anfänglicher Hintergrundfluoreszenz folgt die Phase der exponentiellen Amplifikation, die sich im logarithmischen Maßstab als linearer Anstieg darstellt. In späteren Zyklen kommt es auch hier zum oben beschriebenen Plateaueffekt, durch den genaue Quantifizierungen unmöglich werden. Daher ist es nötig, die Berechnungen in der exponentiellen Phase durchzuführen. Dazu wird im Bereich des linearen Kurvenverlaufs ein Schwellenwert gesetzt. Die Zykluszahl (cycle), bei der die jeweilige Kurve diesen Schwellenwert (threshold) kreuzt, wird als C_T -Wert bezeichnet. Je größer die Menge an eingesetzter DNA ist, desto früher kommt es zum Anstieg der Kurve und desto kleiner ist der C_T -Wert.

Um Unterschiede in der Amplifikationseffizienz und der RNA-Präparation zu minimieren, wird der C_T -Wert jedes Zielgens auf einen internen Standard bezogen. In dieser Arbeit wurde dazu Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als endogenes Kontrollgen verwendet.

Die relative Menge an DNA oder RNA, beispielsweise von stimulierten Zellen bezogen auf unstimulierte, kann mit folgender Formel berechnet werden (komparative Real-time PCR) ²:

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$\Delta\Delta C_T$ bedeutet dabei $(C_{T \text{ Zielgen}} - C_{T \text{ GAPDH}})_{\text{stimuliert}} - (C_{T \text{ Zielgen}} - C_{T \text{ GAPDH}})_{\text{unstimuliert}}$

Um die komparative Methode benutzen zu dürfen, muss zuvor in einem Validierungsexperiment gezeigt werden, dass die Amplifikationseffizienz von Zielgen und endogener Kontrolle ungefähr gleich ist. Kriterium hierfür ist, dass bei Auftragen von ΔC_T gegen die logarithmische Menge an eingesetzter DNA bzw. RNA der Anstieg der Regressionsgeraden $< 0,1$ ist. Abbildung 7 zeigt hierfür die Beispiele von IL-6 und MCP-1.

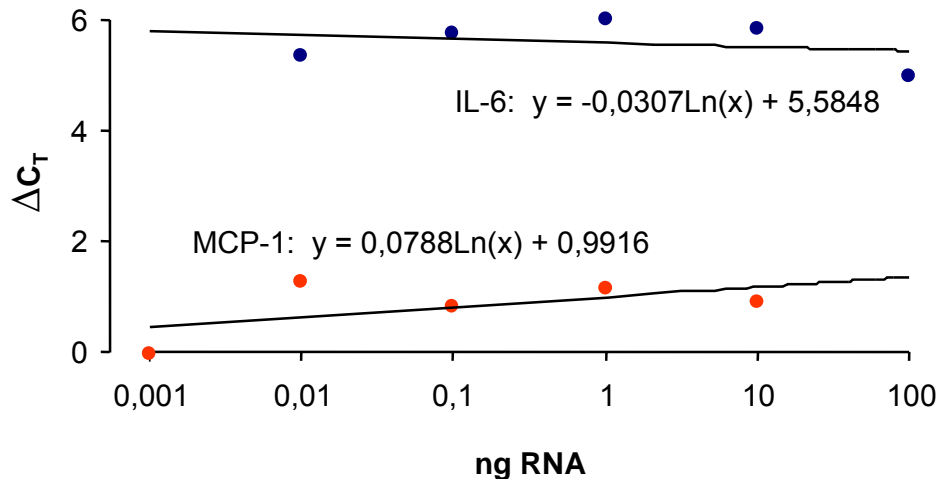


Abbildung 7: Validierungsexperiment

2.5.2 Versuchsdurchführung

Zur RNA-Isolierung wurden die Zellen nach Stimulation unter den oben beschriebenen Konditionen bereits nach zwei Stunden geerntet.

Lyse:

Nach Zentrifugation mit 2000 Umdrehungen pro Minute wurde das Zellpellet in 600 µl Guanidin-Isothiocyanat-haltiger Pufferlösung (Buffer RLT, QIAGEN, Hilden) gelöst, der gemäß Protokoll zuvor β-Mercaptoethanol hinzugefügt wurde. Der Puffer hat eine starke denaturierende Wirkung und inaktiviert dadurch intrazelluläre RNasen. Eine vollständige Lyse der Zellmembranen ist wichtig, um die gesamte RNA der Probe zu gewinnen. Die Zellysate wurden daraufhin bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C gelagert.

Homogenisierung:

Zur RNA-Isolierung wurden die Zellysate nach Auftauen zunächst mit Hilfe von QIAshredder™ (QIAGEN) homogenisiert. Dieser Schritt dient dazu, die Viskosität der Zellysate zu reduzieren und erhöht die Ausbeute der RNA-Isolierung.

RNA-Isolierung:

Anschließend wurde die RNA mit dem RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) gewonnen. Das Prinzip dabei beruht auf einer Bindung der RNA an eine Silica-Gel-Membran, während verunreinigende Substanzen gewaschen werden können. Zuletzt wurde

die isolierte RNA in RNase-freiem H₂O gelöst und die Konzentration spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt.

Reverse Transkription:

Um die RNA in DNA umzuschreiben, wurde eine reverse Transkription mit Omniscript™ RT Kit (QIAGEN), SUPERase•In™ (Ambion, Austin, USA) als RNase-Inhibitor, und Random Primers (Invitrogen, Carlsbad, USA) durchgeführt. Dabei entsteht mit Hilfe einer DNA-Polymerase RNA-komplementäre DNA. Die RNA wird im Anschluss daran durch das Enzym RNase H degradiert. Diese RNase ist spezifisch für RNA in RNA:DNA-Hybriden und greift reine RNA nicht an.

Real-time PCR:

Die PCR erfolgte am Thermocycler ABI Prism™ 7700 Sequence Detection System von Applied Biosystems (Darmstadt). Primer und 6-carboxy-fluorescein (FAM)- bzw. VIC™ (nur GAPDH)-markierte Sonden stammten als Assays-on-Demand® ebenso wie der TaqMan® Universal PCR Master Mix und das nötige PCR Verbrauchsmaterial ebenfalls von Applied Biosystems (Darmstadt). Ansatz und Zyklusprogrammierung der PCR sind in den Tabellen 2 und 3 angegeben. Als C_T-Wert jeder Probe wurde der arithmetische Mittelwert aus zwei Messungen genommen.

Tabelle 2: PCR Ansatz

Reagenzien	Endkonzentration	Eingesetzte Menge
TaqMan® Universal PCR Master Mix	1x	
Forward Primer	900 nmol/l	
Reverse Primer	900 nmol/l	
Sonde	250 nmol/l	
DNA		150 ng (HUVEC) bzw. 100 ng (Mononcl. Zellen)
RNase-freies H ₂ O		ad 25 µl

Auswertung der in vitro-Versuche:

Differenzen zwischen Absolutwerten wurden mit dem t-Test, Differenzen zwischen Relativwerten mit 95%-Konfidenzintervallen getestet.

Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt und p-Werte kleiner als 5% wurden als signifikant beurteilt. Die Grafiken stellen Mittelwert und Standardfehler dar, ein Stern symbolisiert Signifikanz. Die Analysen wurden mit dem Programm SPSS Version 11.5 durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Zytokine und Gerinnungsaktivierung in vivo

3.1.1 Klinische Charakteristika der Patientengruppen

Bezüglich der klinischen Charakteristika wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Patientengruppe mit stabiler Angina pectoris und der mit akutem Myokardinfarkt festgestellt (vgl. Tab. 4). Die mittlere Serum-Creatinkinase der Patienten mit akutem Herzinfarkt betrug 1383 U / l. Während des Klinikaufenthaltes kam es in keinem Fall zu Reinfarkt oder Tod. Bei der Intervention konnte allen Patienten erfolgreich ein Stent implantiert werden. Am Ende der Intervention bestand ein Fluss vom TIMI Grad 3 und die Stenose betrug unter 30% des Gefäßdurchmessers.

Tabelle 4: Charakteristika der Patientengruppen

	Stabile Angina pectoris	Akuter Myokardinfarkt	p
Geschlecht	W = 4; M = 15	W = 4; M = 16	1,0
Alter in Jahren [MW ± SD]	63,6 ± 12,1	58,1 ± 10,8	0,7
Aktive Raucher [n (%)]	10 (50)	5 (24)	0,1
Hypercholesterinämie [n (%)]	15 (75)	14 (67)	0,7
Arterielle Hypertonie [n (%)]	14 (70)	14 (67)	1,0
Diabetes mellitus [n (%)]	6 (30)	10 (48)	0,3
Eingefäßerkrankung [n (%)]	6 (30)	9 (43)	0,8
Zweigegefäßerkrankung [n (%)]	8 (40)	7 (33)	
Dreigegefäßerkrankung [n (%)]	6 (30)	5 (24)	
LAD [n (%)]	8 (40)	12 (57)	0,5
RCx [n (%)]	7 (35)	4 (19)	
RCA [n (%)]	5 (25)	5 (24)	
Max. CK in U / l [MW ± SD]	< 80	1383 ± 1444	< 0,01

3.1.2 Plasmakonzentrationen von TFPI-Xa, F1+2, IL-8 und IL-6

In den Abbildungen sind die Gruppen durchgehend einheitlich markiert. Die Gruppe der Patienten mit elektiver Intervention bei stabiler Angina pectoris (SAP) wird durch die Farbe Grau, die der Patienten mit akutem Myokardinfarkt (AMI) durch Gelb repräsentiert.

Um den Einfluss von FXa und Thrombin auf die Entzündungsaktivität beim akuten Herzinfarkt abzuschätzen, wurden TFPI-Xa, Prothrombinfragment F1+2, das bei der Thrombinbildung entsteht, sowie die inflammatorischen Zytokine IL-8 und IL-6 im Patientenplasma gemessen.

Die Plasmakonzentrationen von TFPI-Xa, F1+2, IL-8 und IL-6 vor Intervention waren bei den Patienten mit akutem Myokardinfarkt signifikant erhöht im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe:

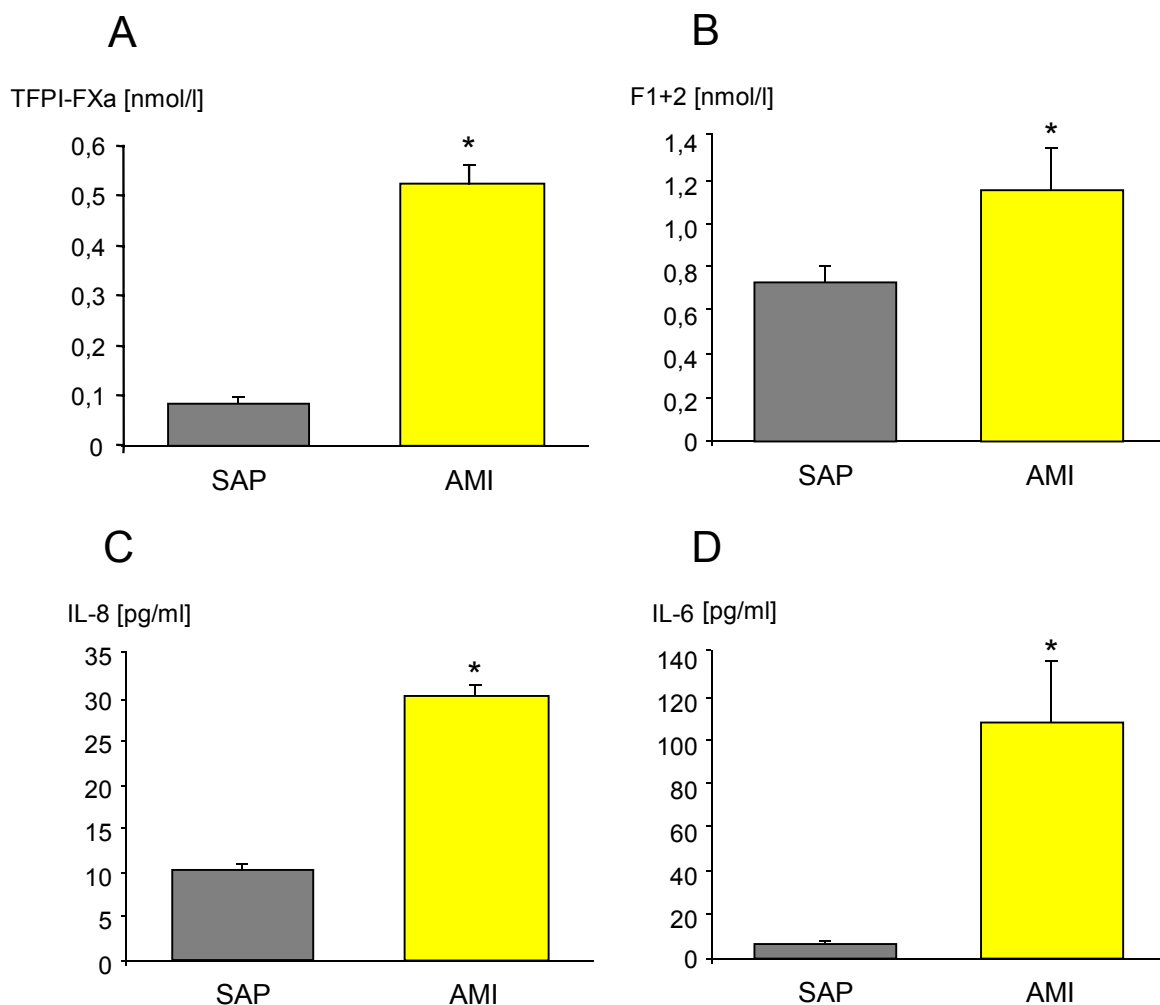


Abbildung 8: Plasmakonzentrationen von TFPI-Xa, F1+2, IL-8 und IL-6 bei stabiler Angina pectoris (SAP) und akutem Myokardinfarkt (AMI)

Im zeitlichen Verlauf der Infarktgruppe über 96 Stunden nahmen die TFPI-Xa Spiegel signifikant ab (Abb. 9 A), während sich die F1+2 Spiegel, die die Thrombinproduktion darstellen, weiterhin signifikant erhöhten (Abb. 9 B). Die Konzentrationen der inflammatorischen Zytokine IL-8 und IL-6 zeigten ein Maximum bei 24 Stunden nach Intervention, das im Vergleich zu den Ausgangswerten signifikant erhöht war und nach 96 Stunden wieder sank (Abb. 9 C und D). Die Werte aller vier Parameter bei den Patienten mit elektiver Intervention zeigten dagegen keine signifikanten Änderungen im Verlauf.

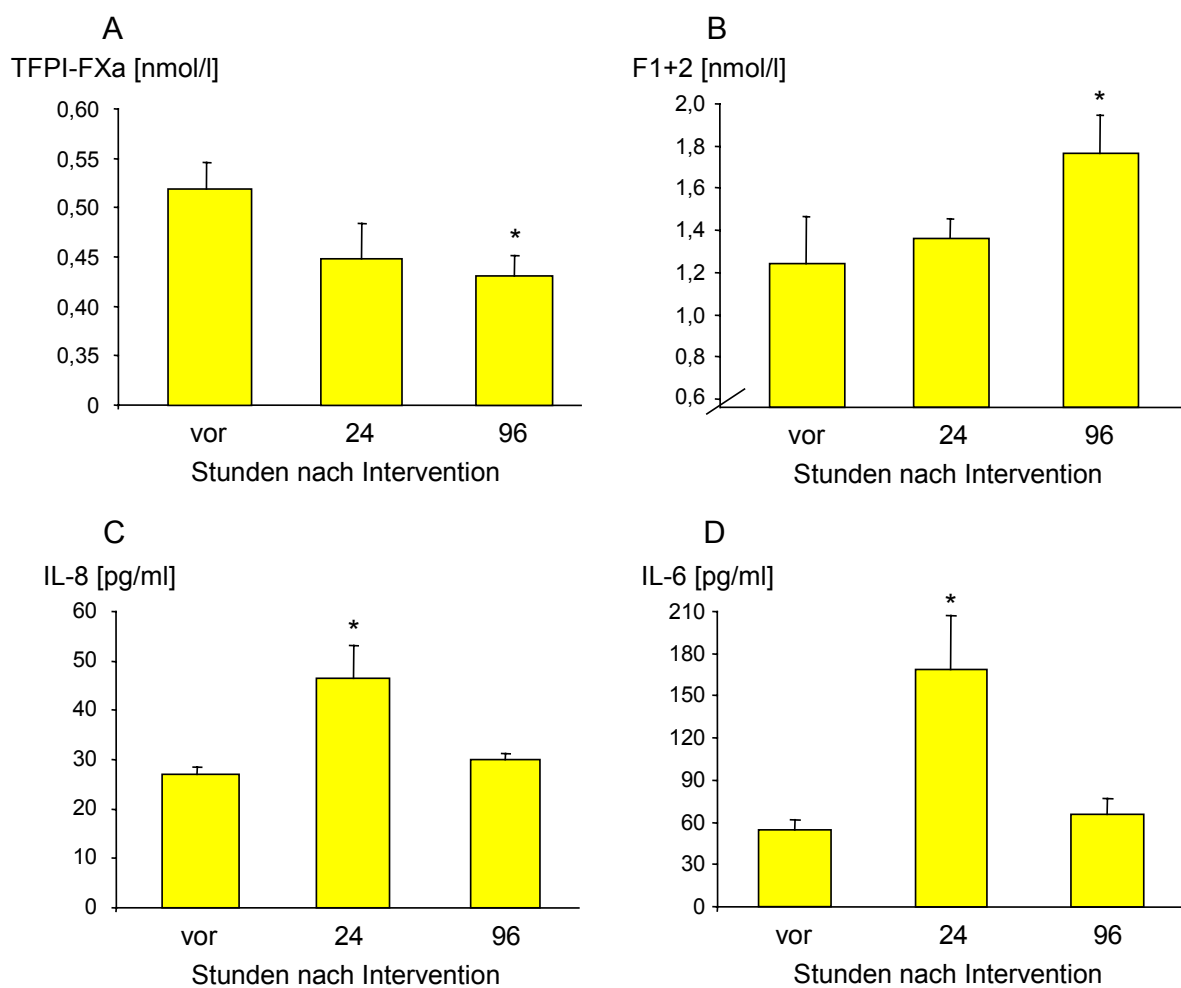


Abbildung 9: Zeitverläufe von TFPI-Xa, F1+2, IL-8 und IL-6 im AMI

Um Hinweise auf den Einfluss der Gerinnungsparameter auf die Entzündungszeichen zu erhalten, wurden die Korrelationen zwischen den Spiegeln von TFPI-Xa und F1+2 einerseits und IL-8 bzw. IL-6 andererseits berechnet. Dabei ergab sich im akuten Myokardinfarkt ein signifikanter Zusammenhang zwischen FXa, gemessen als TFPI-Xa Komplex, und IL-8 vor und 24 Stunden nach Intervention. Im Gegensatz dazu korrelierte das Prothrombinfragment F1+2, das die Thrombinproduktion in vivo repräsentiert, nicht mit den IL-8 Spiegeln.

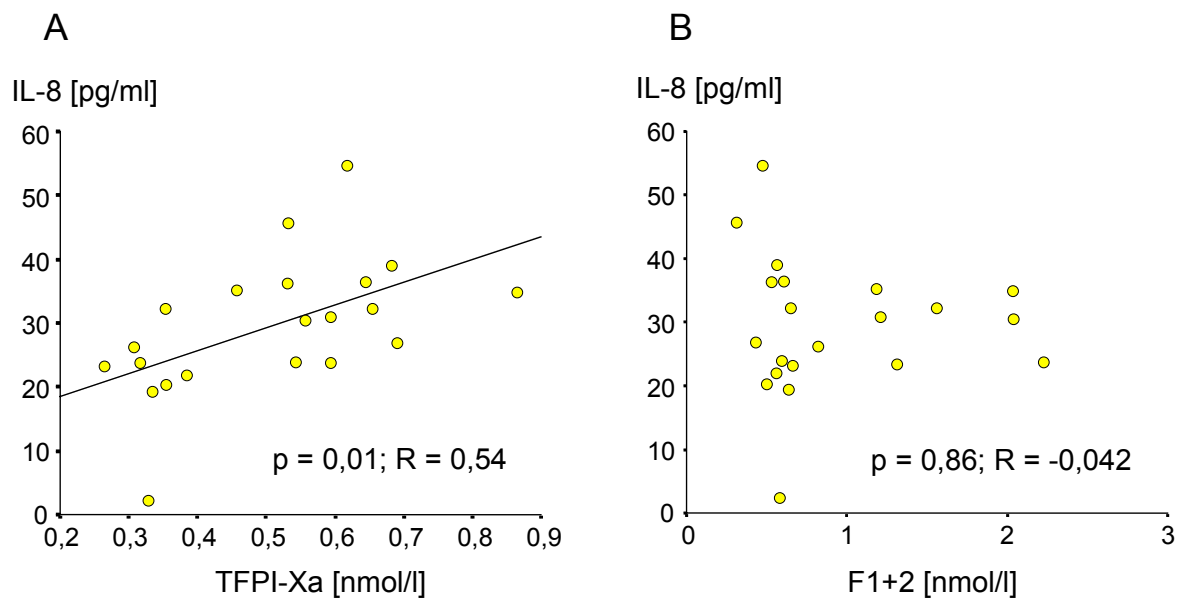


Abbildung 10: Korrelationen zwischen TFPI-Xa bzw. F1+2 und IL-8 im akuten Myokardinfarkt vor Intervention

Das andere untersuchte Zytokin, IL-6, zeigte bei Aufnahme in die Klinik zunächst keine Assoziation zu den TFPI-Xa Spiegeln (s. Tab. 5). Erst nach 24 und 48 Stunden korrelierten die Werte mit den TFPI-Xa Spiegeln vor Intervention:

Tabelle 5: Korrelationen zwischen TFPI-Xa und IL-6 im akuten Myokardinfarkt

	p	R
bei Aufnahme	0,08	0,74
nach 24 Stunden	0,006	0,46
nach 48 Stunden	0,001	0,52

Entsprechend den Ergebnissen für IL-8 fand sich auch für IL-6 kein Zusammenhang mit dem Prothrombinfragment F1+2. Ebenso zeigten sich in der Kontrollgruppe der Patienten mit SAP keinerlei Assoziationen zwischen den Spiegeln der Gerinnungsparameter und denen der Entzündungszeichen.

3.2 Zytokine und Gerinnungsaktivierung *in vitro*

Da die TFPI-Xa Spiegel eine Aktivierung der Gerinnungskaskade an einem Schritt vor der Thrombinbildung widerspiegeln, wurden nun die Effekte von FXa und FVIIa auf die Zytokinexpression in mononukleären Zellen und Endothelzellen (HUVEC) untersucht, da diese Zellen in direktem Kontakt mit dem zirkulierenden Blut stehen und daher zu den beobachteten Entzündungsreaktionen beitragen können.

In den Abbildungen sind die Gruppen wiederum einheitlich markiert. Unstimulierte Zellen werden durch blaue Balken, mit FXa stimulierte durch rote Balken dargestellt. Die Farben orange und grün stehen für PAR-1 bzw. PAR-2.

3.2.1 Dosis-Wirkungskurven und Zeitabhängigkeit

Zunächst wurde in Vorversuchen mit Immunoassays nach einer geeigneten Konzentration und Dauer für die Stimulationen gesucht. Die Dosisfindungsexperimente wurden mit einer Dauer von 20 Stunden durchgeführt, die Zeitversuche mit einer FXa-Konzentration von 15 µg/ml. Diese Werte stellten sich als sinnvoll heraus und wurden für die weiteren Experimente beibehalten.

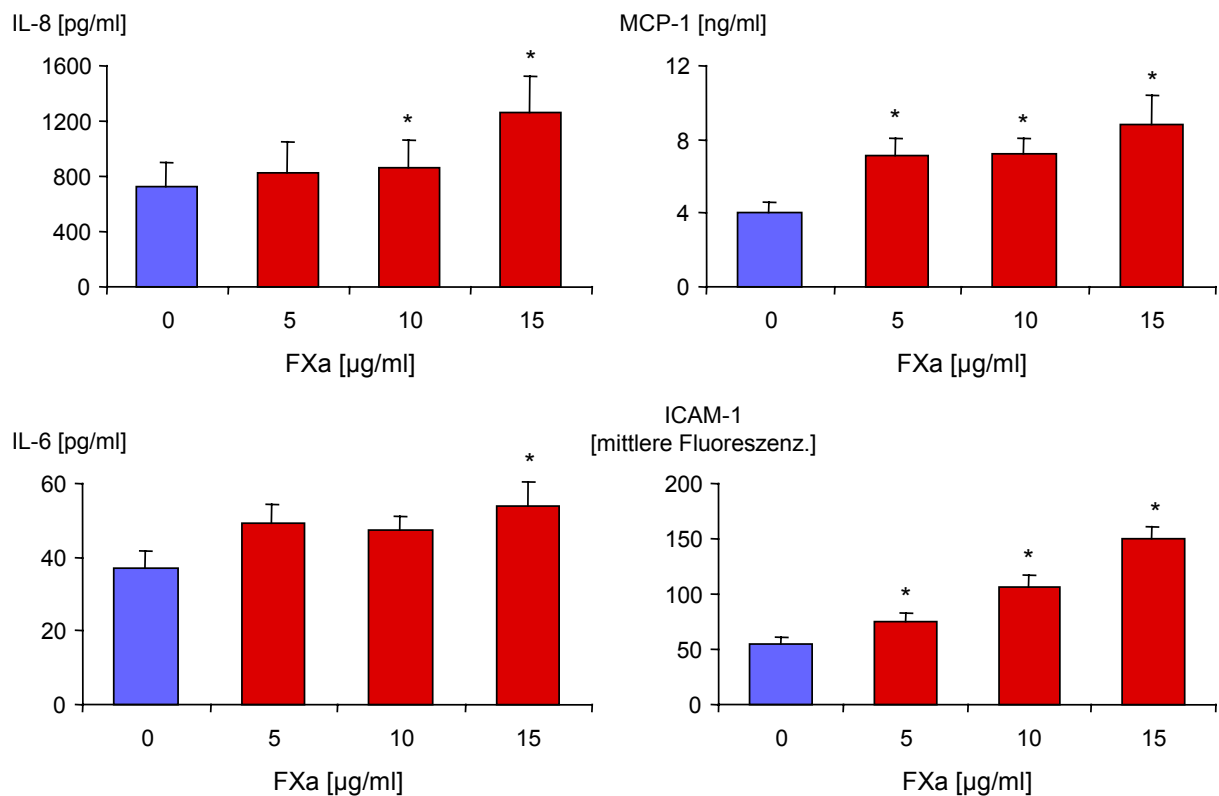


Abbildung 11: Dosisabhängige Steigerung der Freisetzung von IL-8, MCP-1 und IL-6 sowie der Expression von ICAM-1 durch FXa bei Endothelzellen

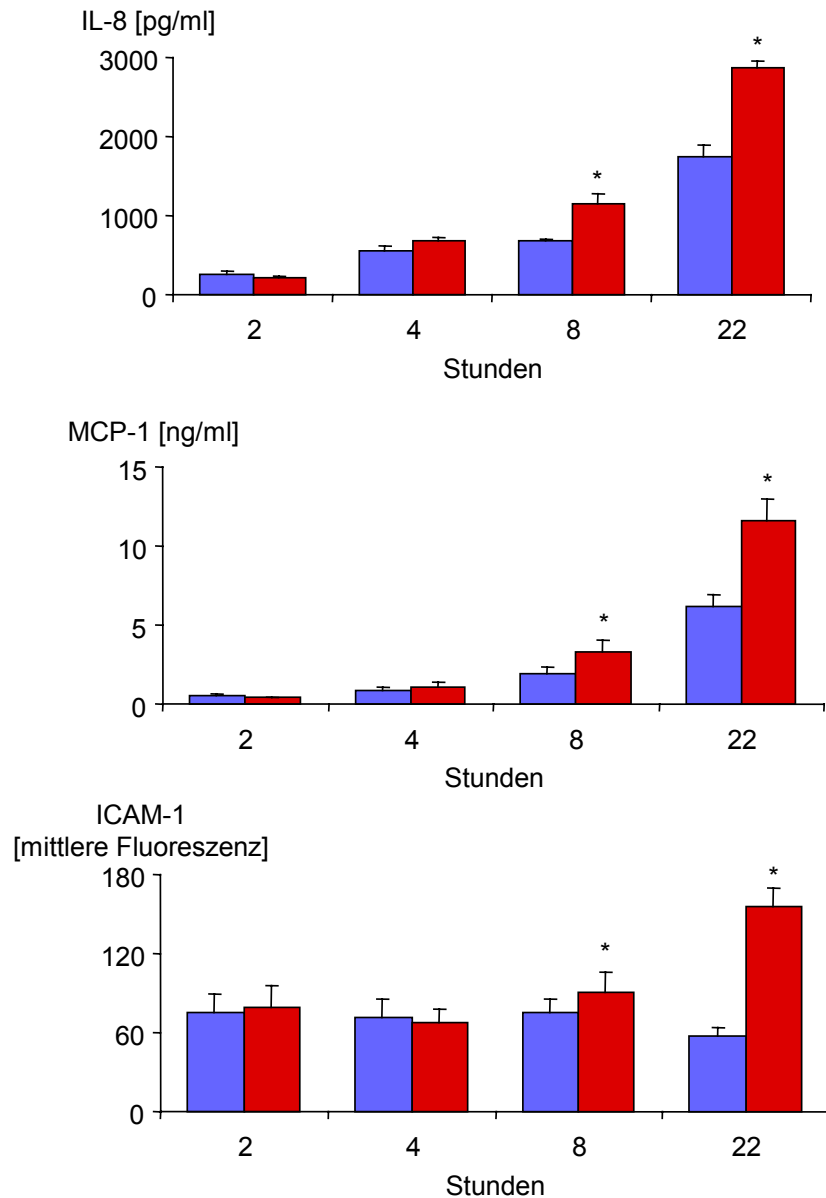


Abbildung 12: Zeitabhängige Steigerung der Freisetzung von IL-8, MCP-1 und IL-6 sowie der Expression von ICAM-1 durch FXa bei Endothelzellen

Analoge Versuche wurden statt mit FXa auch mit FVIIa und den agonistischen Peptiden SFLLRN und SLIGKV durchgeführt. Diese aktivieren selektiv den PAR-1 bzw. PAR-2 Rezeptor.

3.2.2 Spezifität

Um nachzuweisen, dass die beim FXa beobachteten Effekte spezifisch für diesen Faktor sind, wurde der synthetische FXa-Inhibitor MC53255 (Morphochem) eingesetzt. Er führte zu einer dosisabhängigen Inhibition der IL-8 Freisetzung in Endothelzellen, wobei die IC50, also die Konzentration, die für eine 50%ige Inhibition benötigt wird, 230 nmol/l betrug. Die beobachtete IL-8 Produktion wurde dabei nicht durch sekundär generiertes Thrombin verursacht, da die Anwesenheit des Thrombininhibitors Lepirudin keinen Einfluss auf die IL-8 Freisetzung durch FXa hatte (Abb. 13). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für mononukleäre Zellen.

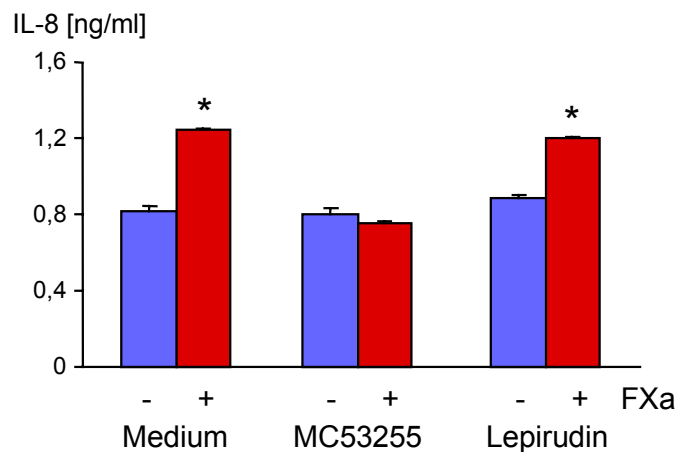


Abbildung 13: Wirkung einer Thrombininhibition (Lepirudin) und FXa-Inhibition (MC53255) auf die FXa-induzierte IL-8 Freisetzung

3.2.3 Endothelzellen

FXa führte bei HUVEC zu einem signifikanten Anstieg der Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-8, IL-6 und MCP-1 (Abb. 14 A, C, E) sowie des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (Abb. 15). Im Gegensatz dazu ließ sich nach zweistündiger Stimulation mit FXa eine erhöhte RNA-Konzentration nur für IL-8 und MCP-1 nachweisen, nicht jedoch für IL-6 (Abb. 14 B, D, F).

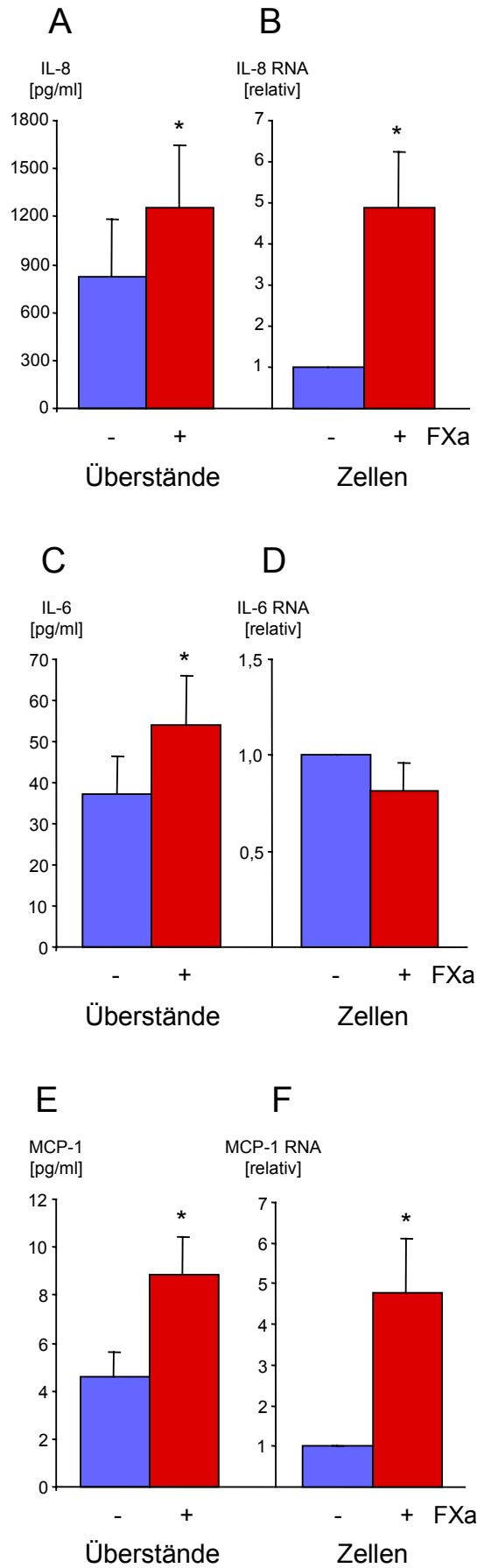


Abbildung 14: Zytokinproduktion nach FXa Stimulation in Endothelzellen

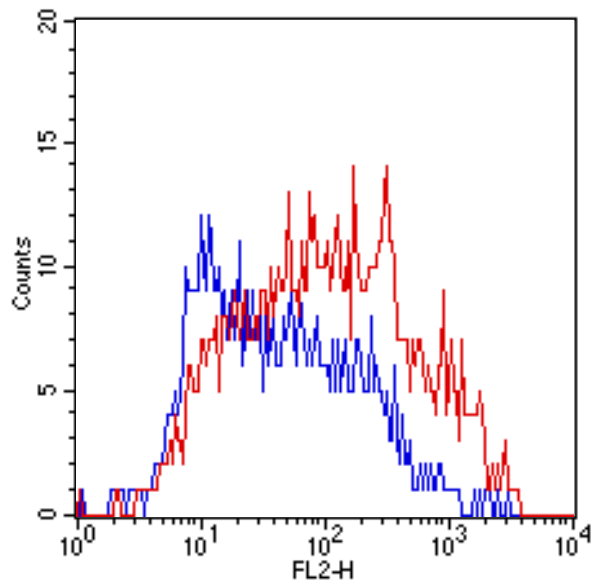


Abbildung 15: ICAM-Dichte auf Endothelzellen ohne (blau) und mit (rot) Stimulation mit FXa (Beispiel)

3.2.4 Mononukleäre Zellen

Ähnliche Ergebnisse wie bei den Endothelzellen ergaben sich auch für mononukleäre Zellen. Auch hier induzierte FXa eine Freisetzung der Zytokine IL-8, IL-6 und MCP-1 (Abb. 16 A, C, E). Signifikant erhöhte RNA-Spiegel wurden für IL-8 gefunden, nicht jedoch für IL-6 oder MCP-1 (Abb. 16 B, D, F).

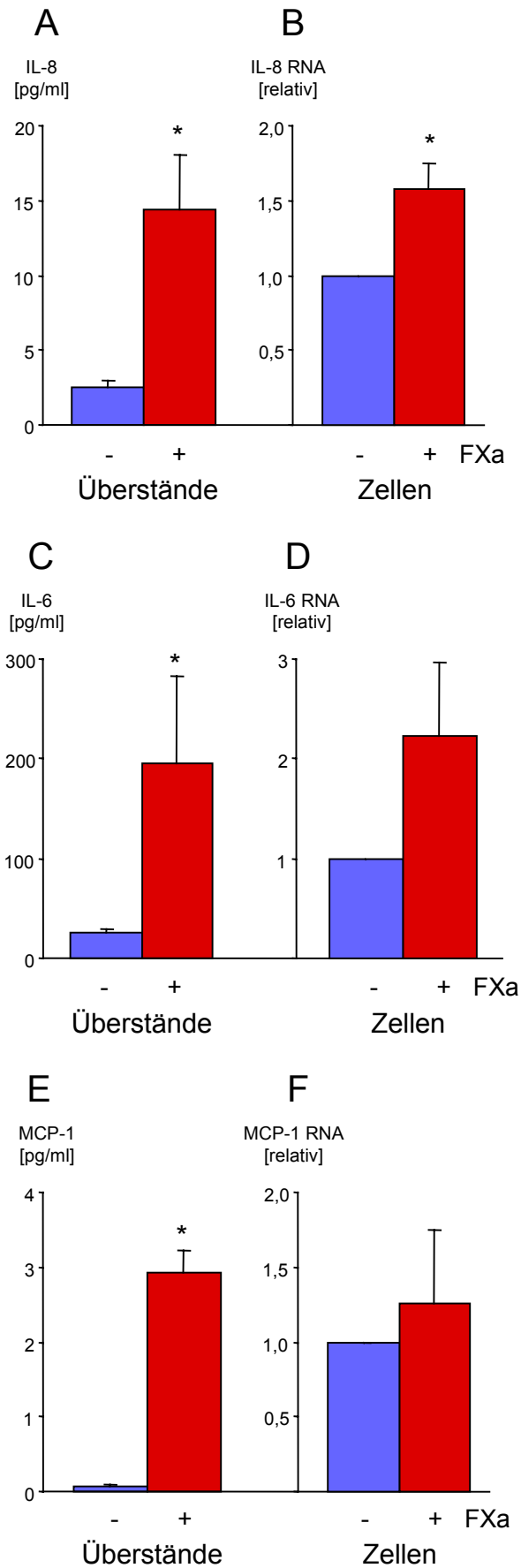


Abbildung 16: Zytokinproduktion nach FXa Stimulation in mononukleären Zellen

3.2.5 Gerinnungsfaktor VIIa

Im Gegensatz zu FXa führte FVIIa weder bei Endothelzellen noch bei mononukleären Zellen zu einer nennenswerten Steigerung der Zytokinfreisetzung. Vereinzelt waren die Unterschiede zu unstimulierten Zellen zwar signifikant (IL-8 bei HUVEC: Steigerung um den Faktor 1,3; MCP-1 bei mononukleären Zellen: Faktor 1,8), jedoch sowohl für sich gesehen als auch besonders im Vergleich zu FXa (Faktoren 2,3 bzw. 42,0) minimal. Abbildung 17 verdeutlicht diesen Eindruck auch auf RNA-Ebene. Als Positivkontrolle wurde in diesem Beispiel eine Stimulation mit IL-1 β durchgeführt.

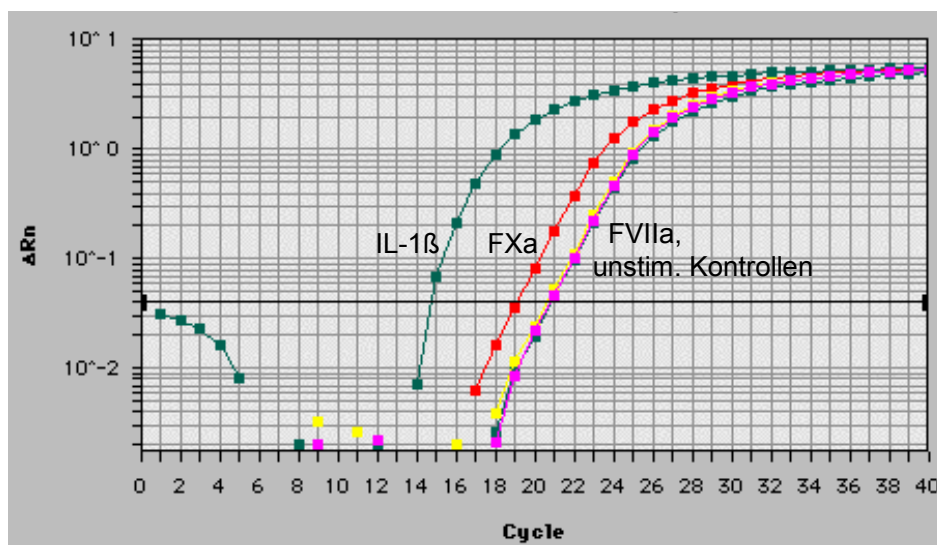


Abbildung 17: Stimulation von Endothelzellen mit FXa (rot) und FVIIa (gelb); IL-1 β (grün) als Positivkontrolle, unstimulierte Zellen (pink und grün rechts) als Negativkontrollen

3.2.6 Protease-aktivierte Rezeptoren

Es ist bekannt, dass FXa Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) aktivieren kann (s. Kapitel 1.2.4). Um die unterschiedlichen Effekte von FXa auf mononukleäre Zellen und Endothelzellen genauer zu untersuchen, wurden die RNA-Konzentrationen von PAR-1 und PAR-2 in Proben beider Zelltypen mit quantitativer PCR gemessen.

Gleichzeitig mit den Proben wurde eine Verdünnungsreihe von bekannten Molekülmengen der beiden Rezeptoren-RNAs mitgemessen, was nicht nur relative sondern auch absolute Mengenangaben ermöglichte. Dabei ergab sich eine viermal größere Menge von PAR-1 in HUVEC im Vergleich zu mononukleären Zellen (40 000 bzw. 10 000 Moleküle / 150 ng RNA). Im Gegensatz dazu war die PAR-2 Expression der HUVEC gering (200 Moleküle / 150 ng RNA) und nur Spuren davon fanden sich in mononukleären Zellen (8 Moleküle / 150 ng RNA).

Da bekannt ist, dass FXa über PAR-1 und PAR-2 Zellen stimulieren kann (s.o.), wurden die Auswirkungen der PAR-1 und PAR-2 Aktivierung auf die ICAM-Dichte von Endothelzellen und die Zytokinfreisetzung durch Endothel- und mononukleäre Zellen mit Hilfe der PAR-agonistischen Peptide SFLLRN und SLIGKV parallel zu FXa untersucht.

Da die einzelnen Substanzen z.T. in verschiedenen Versuchen getestet wurden, und sich die Zellzahlen zwischen den Versuchen deutlich unterschieden, wurden die Berechnungen auf die jeweilige unstimulierte Kontrolle bezogen. Die Angaben in diesen Abbildungen sind deshalb keine Absolut-, sondern Relativwerte.

Wie schon gezeigt, führte FXa zu einem klaren Anstieg der Parameter. Die Wirkung von SFLLRN, das PAR-1 aktiviert, war bei Endothelzellen sogar noch ausgeprägter, während der Effekt des PAR-2 Agonisten SLIGKV dagegen deutlich geringer ausfiel.

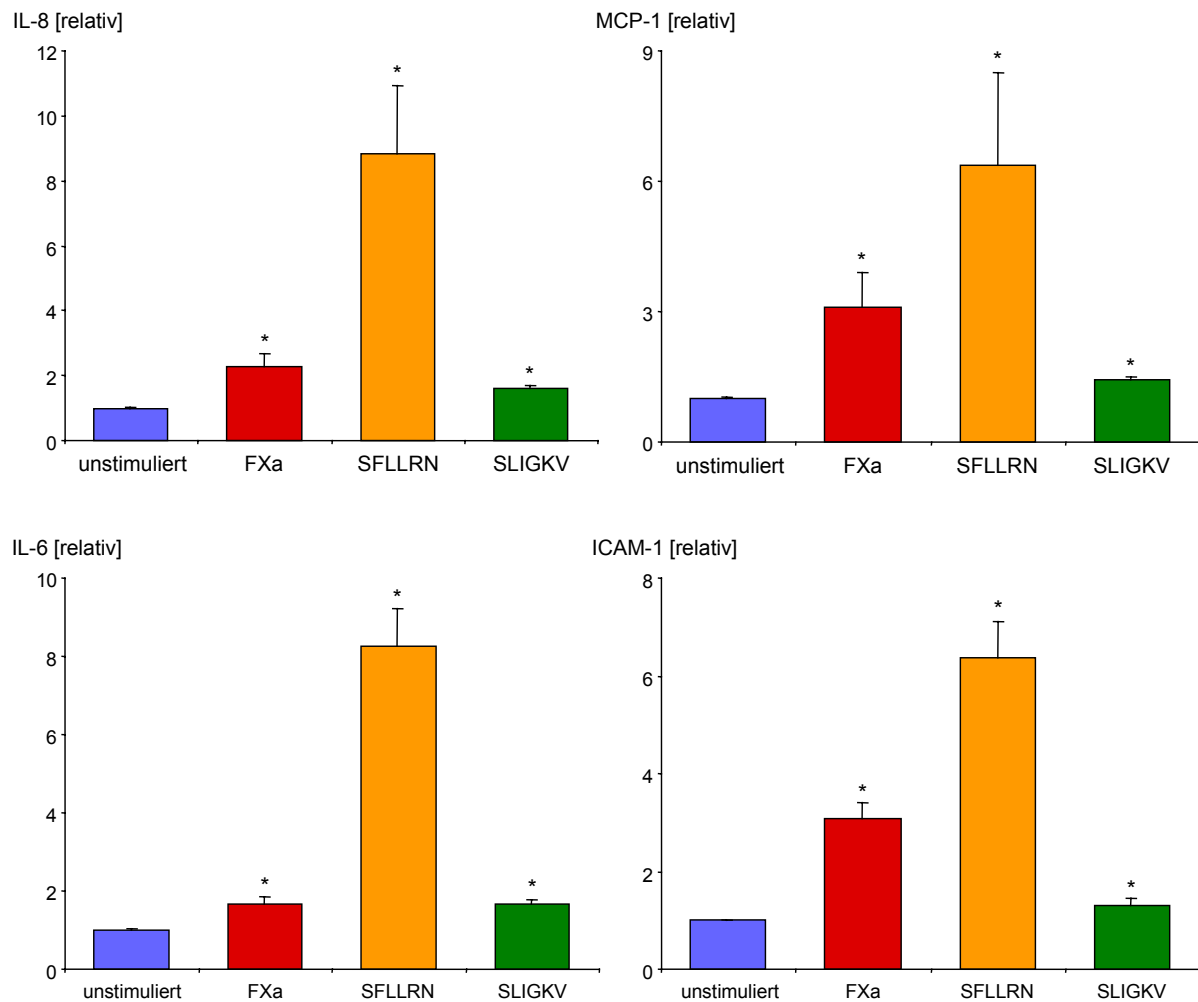


Abbildung 18: Effekte von FXa sowie der PAR-1 und PAR-2 agonistischen Peptide auf die Freisetzung von IL-8, MCP-1 und IL-6 sowie der Expression von ICAM-1 bei Endothelzellen

Bei den mononukleären Zellen war der Effekt von SFLLRN nicht so ausgeprägt wie der von FXa, dagegen bewirkte die PAR-2 Stimulation überhaupt keine nennenswerte Steigerung der Zytokinfreisetzung:

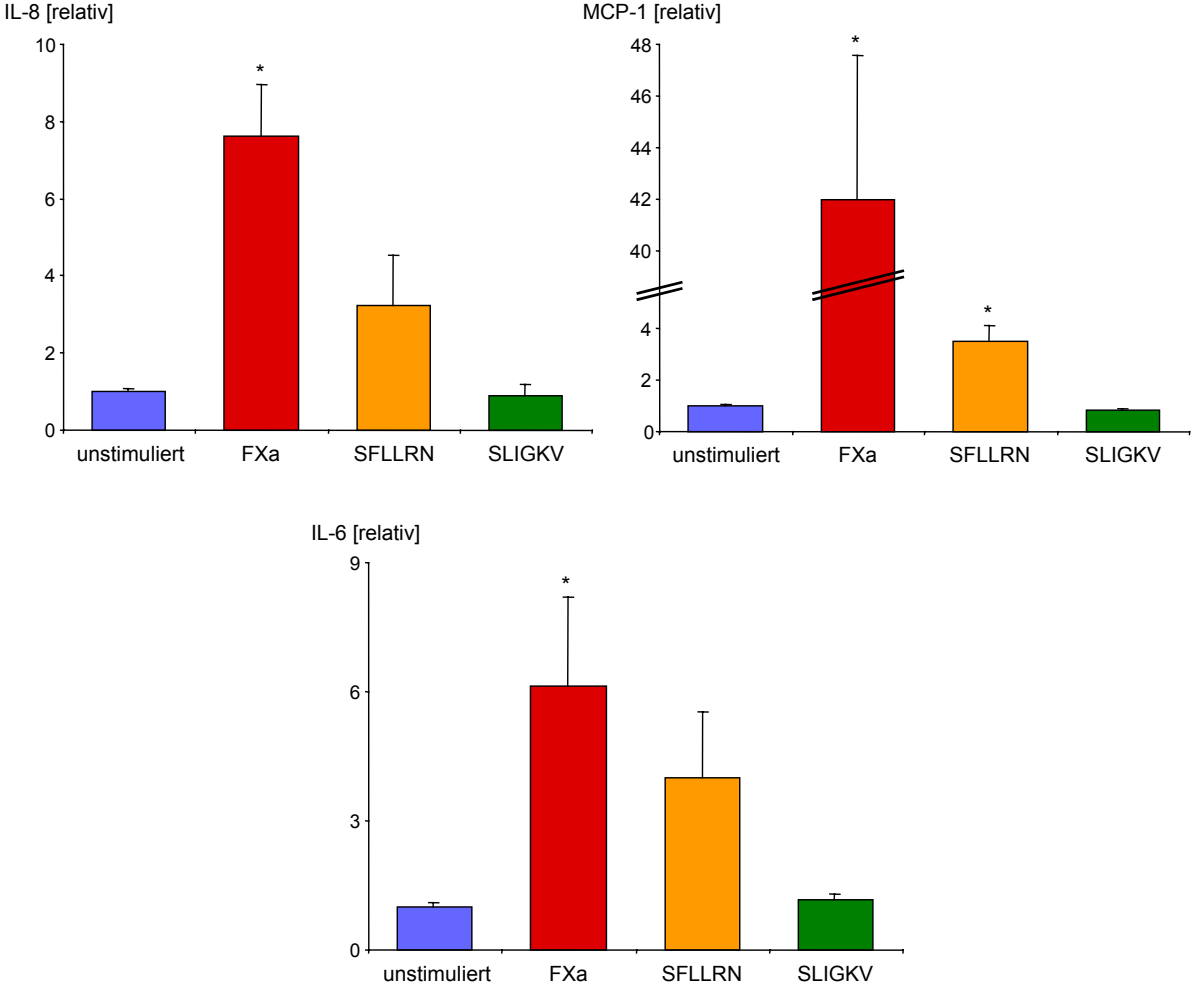


Abbildung 19: Effekte von FXa sowie der PAR-1 und PAR-2 agonistischen Peptide auf die Freisetzung von IL-8, MCP-1 und IL-6 bei Endothelzellen

Die Ergebnisse legen nahe, dass die Zytokinfreisetzung nach Stimulation mit FXa überwiegend durch eine Aktivierung von PAR-1 verursacht wird.

Um diese Hypothese zu bekräftigen, wurde bei HUVEC gleichzeitig mit Stimulation durch FXa entweder PAR-1 oder PAR-2 gehemmt. Das Peptid YFLLRNP, das insbesondere die PAR-2 Aktivierung inhibiert ⁴, zeigte keinen Effekt auf die Freisetzung von IL-8, während der anti-PAR-1 Antikörper ATAP2 die Wirkung von FXa vollständig aufhob.

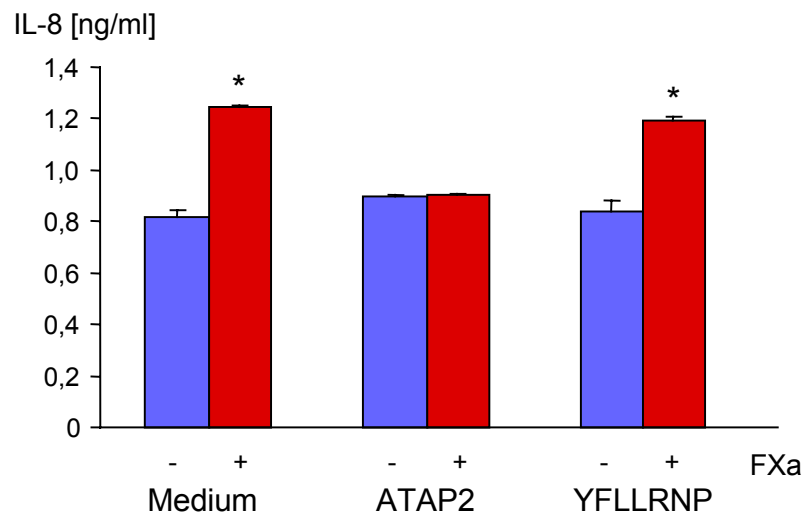


Abbildung 20: Wirkung einer PAR-1 (ATAP2)- und PAR-2 (YFLLRN)-Inhibition auf die FXa-induzierte IL-8 Freisetzung

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt finden sich erhöhte Zeichen einer Gerinnungsaktivierung sowie einer Entzündungsreaktion.
2. Nur der TFPI-Xa-Komplex korreliert mit den Entzündungszeichen im AMI, nicht jedoch das Prothrombinfragment F1+2.
3. Bei Endothel- und mononukleären Zellen induziert FXa eine spezifische, dosis- und zeitabhängige Freisetzung inflammatorischer Zytokine auf Protein- und RNA-Ebene.
4. FVIIa dagegen bewirkt weder bei Endothel- noch bei mononukleären Zellen eine nennenswerte Zytokinfreisetzung.
5. Die Wirkung von FXa wird überwiegend über eine Aktivierung von PAR-1 vermittelt.

4.2 Zusammenhang zwischen erhöhten TFPI-Xa-Spiegeln und zirkulierenden inflammatorischen Zytokinen beim akuten Myokardinfarkt

Erhöhte Spiegel von TFPI-Xa und dem Prothrombinfragment F1+2 weisen auf eine Aktivierung der Gerinnungskaskade im akuten Myokardinfarkt hin. Unter normalen Bedingungen ist die Beziehung zwischen TFPI-Xa Komplexen und F1+2 indirekt proportional und lässt vermuten, dass TFPI-Xa die Aktivität der Prothrombinase in vivo reguliert ²⁵. In Situationen, in denen es zu einer Aktivierung der Gerinnungskaskade kommt, treten jedoch erhöhte Plasmaspiegel von TFPI-Xa auf ^{31, 51, 52}.

Bei der Gerinnungsaktivierung im akuten Myokardinfarkt sind diese erhöhten TFPI-Xa Spiegel, nicht aber F1+2, mit erhöhten Plasmakonzentrationen des proinflammatorischen Zytokins IL-8 assoziiert. Darüber hinaus korrelieren im Verlauf des akuten Myokardinfarkts die IL-6 Spiegel mit den anfänglichen TFPI-Xa Spiegel. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass FXa eine proinflammatorische Rolle im akuten Myokardinfarkt spielt, die unabhängig von Thrombin ist.

Bekannt ist, dass aktivierte Gefäßendothelzellen, die die Grenze bilden zwischen zirkulierenden Entzündungszellen und umgebendem Gewebe, zur Entstehung von Entzündungsreaktionen beitragen, indem sie proinflammatorische Zytokine und Chemokine sezernieren¹⁹, wie z.B. IL-8. Die starke chemotaktische Eigenschaft von IL-8 für polymorphonukleäre neutrophile Zellen steht im Zusammenhang mit postischämischen Reperfusionsschäden⁶⁸ und einem erhöhten Risiko für ein systemic inflammatory response syndrome (SIRS)¹⁹. Da proinflammatorische Vorgänge bei akuten Koronarsyndromen eine der wichtigsten Einflussgrößen für die Prognose zu sein scheinen^{7, 8, 15, 16, 27, 32, 35, 36, 37, 46, 64}, kann die Kenntnis über Ursachen für derartige Entzündungsreaktionen zur Entwicklung von neuen Therapieansätzen beitragen, die den klinischen Verlauf verbessern.

Bisher zeigten antiinflammatorische Behandlungen keinen eindeutigen Nutzen für Patienten mit akutem Myokardinfarkt²⁴. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass eine Therapie mit FXa Inhibitoren Thrombininhibitoren überlegen ist. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit niedermolekularem Heparin, das im Gegensatz zu unfraktioniertem Heparin auch anti-FXa Aktivität besitzt, Entzündungsreaktionen in vitro und in vivo reduziert^{1, 23, 41, 44}.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Protease FXa über inflammatorische Fähigkeiten verfügt, die nicht durch Thrombin vermittelt sind. Darin könnten die nicht nur antikoagulatorischen sondern auch antiinflammatorischen Wirkungen von FXa-Inhibitoren im akuten Myokardinfarkt begründet sein. Auch in experimentellen Studien wurde belegt, dass eine antikoagulatorische Therapie nicht nur die Gerinnungsaktivierung hemmt, sondern auch Entzündung reduziert^{14, 20, 28}. Diese Resultate bekräftigen die Hypothese eines Zusammenhangs zwischen Gerinnungsaktivierung und Zytokinfreisetzung in vivo.

4.3 Bedeutung von FXa und FVIIa und Rolle der Protease-aktivierten Rezeptoren

Die Feststellung, dass TFPI-FXa, nicht jedoch Prothrombinfragment F1+2, mit IL-8 bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt korreliert, lässt vermuten, dass FXa mehr noch als Thrombin zu den akuten Entzündungsreaktionen im akuten Myokardinfarkt beiträgt.

In genetischen Studien ¹³ wurde eine Aktivierung von Protease-aktivierten Rezeptoren als Voraussetzung für die Signaltransduktion von FXa identifiziert. Die Bedeutung der PAR-Aktivierung für die Zytokinfreisetzung von Endothelzellen und mononukleären Zellen wird in der vorliegenden Arbeit durch die in vitro Experimente mit agonistischen Peptiden untermauert. In diesen Versuchen wird die Rolle von PAR-2 zwar möglicherweise unterschätzt, da PAR-2 auf Endothel- und mononukleären Zellen in viel geringerem Maß vorhanden ist als PAR-1, aber im Gegensatz zu PAR-1 nach Stimulation mit Zytokinen verstärkt exprimiert ⁵⁰ und in atherosklerotischen Gefäßen hochreguliert wird ²⁶. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass das PAR-1 aktivierende Peptid SFLLRN auch PAR-2 aktivieren kann ^{10, 30, 34}. Jedoch wurde die FXa induzierte Zytokinfreisetzung nach Inhibition von PAR-1 vollständig aufgehoben, was darauf hinweist, dass die Aktivierung von PAR-1 für die beobachtete Entzündungsreaktion nach Stimulation mit FXa ausreichend ist.

Im Gegensatz zu FXa bewirkte FVIIa keine nennenswerte Steigerung der Zytokinproduktion sowohl von Endothel- als auch von mononukleären Zellen. Dabei müssen allerdings zwei Faktoren berücksichtigt werden: Zum einen benötigt FVIIa als Rezeptor auf der Zelloberfläche Tissue factor, der auf Endothel- und mononukleären Zellen nur gering bzw. fast gar nicht exprimiert wird ⁴⁵. Zum anderen ist PAR-2, der hauptsächlich für die Signalübermittlung von FVIIa verantwortlich ist ¹², auf diesen Zellen in wesentlich geringerem Maß vorhanden als PAR-1. Doch auch hier muss darauf hingewiesen werden, dass außer PAR-2, wie oben beschrieben, auch Tissue factor nach Zytokinstimulation verstärkt exprimiert wird ^{39, 45}. Dadurch könnte FVIIa in atherosklerotischen Gefäßen ⁶⁷ und im akuten Herzinfarkt ⁴⁸ eine weitaus größere Bedeutung besitzen, als die Ergebnisse dieser Arbeit vermuten lassen.

Die Aktivierung von kardialen Leukozyten im akuten Myokardinfarkt und ihre Freisetzung von IL-8 und Thrombomodulin spiegeln die Stimulierung der Endothelzellen und Leukozyten im reperfundierten Herzmuskel wider und könnten zur Entstehung von systemischen Entzündungsreaktionen beitragen ⁴⁹. Da die Bildung eines intrakoronaren Thrombus der Entwicklung eines Myokardinfarkts vorausgeht, könnten aktivierte Gerinnungsfaktoren Endothelzellen und Leukozyten stimulieren. Somit entsteht möglicherweise über die Aktivierung von PARs im Infarktareal ein Zusammenhang zwischen der Bildung von FXa und der Freisetzung inflammatorischer Zytokine.

Dies könnte der Mechanismus sein, der der beobachteten Korrelation von zirkulierendem TFPI-Xa und IL-8 im akuten Myokardinfarkt zugrunde liegt. Eine antikoagulatorische Therapie mit anti-FVIIa oder anti-FXa Komponente ist daher einer reinen Thrombininhibition eventuell überlegen, weil sie neben der Thrombinbildung auch die PAR-Aktivierung verhindert. Auf diesem Weg besitzt sie eine zusätzliche antiinflammatorische Wirkung, die einer Therapie mit Thrombininhibitoren oder Heparin alleine fehlt.

4.4 Spezifität

Bei Experimenten, die sich mit den zellulären Effekten verschiedener Gerinnungsfaktoren befassen, besteht stets die Gefahr der Aktivierung interferierender Proteasen. Aus diesem Grund wurden die beschriebenen Versuche in Abwesenheit von Serum durchgeführt, welches derartige Proteasen enthält. Da die Stimulation der IL-8 Freisetzung durch FXa einzig durch die Gegenwart eines FXa-Inhibitors, nicht jedoch eines Thrombininhibitors, neutralisiert wurde, kann von einer Spezifität der beobachteten Effekte für FXa ausgegangen werden.

4.5 Interleukin-6

Die Auswirkungen von FXa auf die Produktion der verschiedenen Zytokine sind unterschiedlich. Interleukin-8 wurde sowohl bei Endothel- als auch bei mononukleären Zellen auf RNA- und Proteinebene induziert. Für Interleukin-6 dagegen zeigte sich zwar nach 20stündiger Stimulation ein Anstieg der Proteinfreisetzung, die RNA-Konzentrationen waren nach nur 2 Stunden aber nicht erhöht. Berücksichtigt man, dass bei den Patienten mit akutem Myokardinfarkt die IL-6 Spiegel erst nach 24 Stunden mit den anfänglichen TFPI-FXa Spiegeln korrelierten, liegt die Vermutung nahe, dass IL-6 nicht unmittelbar durch FXa induziert wird, sondern eventuell erst durch die Freisetzung anderer Zytokine wie IL-8.

Um dieser Vermutung nachzugehen, konnte in Experimenten, die über die vorliegende Arbeit hinausgehen, die IL-6 Freisetzung von Endothelzellen durch einen anti-IL-8-Antikörper gehemmt werden, der produziertes IL-8 bindet und inaktiviert. Allerdings war IL-8 alleine für die Induktion von IL-6 nicht ausreichend, da eine Stimulation mit rekombinantem IL-8 keinen Anstieg der IL-6 Konzentrationen bewirkte. Möglicherweise ist die Bildung von IL-8 also eine notwendige, aber nicht hinreichende Bedingung für die Produktion von IL-6. Die genauen Mechanismen müssten jedoch noch in weiteren Versuchen erforscht werden.

5 Zusammenfassung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine Gerinnungsaktivierung im akuten Myokardinfarkt und legen einen Mechanismus dar, wie Gerinnungsfaktor FXa systemische IL-8 Konzentrationen erhöhen kann.

Bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt sind Entzündungszeichen und Parameter der Gerinnungsaktivierung erhöht. Dabei besteht eine Korrelation zwischen den Spiegeln von TFPI-FXa Komplex und proinflammatorischen Zytokinen. Im Gegensatz dazu steht die Bildung von Thrombin, die anhand des Prothrombinfragments F1+2 gemessen wurde, in keinem Zusammenhang mit den Entzündungsparametern.

In vitro induziert FXa die Freisetzung der proinflammatorischen Mediatoren IL-8, IL-6 und MCP-1 durch Endothelzellen und mononukleäre Zellen. In Weiterführung bisheriger Studien^{33, 62} wurde die Transkriptionsaktivierung von IL-8 und MCP-1 durch FXa bei Endothelzellen und die Zytokinfreisetzung durch FXa bei mononukleären Zellen nachgewiesen. Die Funktionsweise der IL-6 Freisetzung erfordert weitergehende Untersuchungen.

FXa Inhibitoren können somit die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren reduzieren, die möglicherweise über eine Aktivierung von Protease-aktivierten Rezeptoren vermittelt wird. Da das Ausmaß der Entzündungsreaktionen für die Prognose von Patienten mit akutem Myokardinfarkt entscheidend ist, könnte die Inhibition der Gerinnungskaskade an einem Schritt vor der Bildung von Thrombin den klinischen Verlauf günstig beeinflussen.

6 Verzeichnisse

6.1 Abkürzungen

AMI	akuter Myokardinfarkt
ATAP2	anti-PAR-1 Antikörper
CK	Creatinkinase
CRP	C-reaktives Protein
C _T	Zykluszahl bei Überschreiten des Schwellenwerts
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F1+2	Prothrombinfragment
FAM	6-carboxy-fluorescein
FVIIa	aktivierter Gerinnungsfaktor VII
FXa	aktivierter Gerinnungsfaktor X
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HUVEC	Endothelzellen von humanen Umbilikalvenen
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül
IE	internationale Einheiten
IL	Interleukin
LAD	left anterior descending coronary artery
MC53255	synthetischer FXa-Inhibitor
MCP	Monozyten-chemotaktisches Protein
MW	Mittelwert
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
RCA	right coronary artery
RCx	ramus circumflexus
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SAP	stabile Angina pectoris

SD	Standardabweichung
SFLLRN	aktivierendes Peptid für PAR-1 (Aminosäuresequenz)
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SLIGKV	aktivierendes Peptid für PAR-2 (Aminosäuresequenz)
TIMI	Thrombolysis in Myocardial Infarction
TF	Tissue factor
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
UNG	Uracil-N-Glykosylase

6.2 Abbildungen

Abbildung 1:	Extrinsische Gerinnungskaskade	6
Abbildung 2:	Schema des Tissue factor pathway inhibitors	8
Abbildung 3:	Schema der Protease-aktivierten Rezeptoren.....	10
Abbildung 4:	Monozytenisolierung durch einen Dichtegradienten.....	15
Abbildung 5:	Prinzip der Real-time PCR	18
Abbildung 6:	Beispiel einer Real-time PCR Messung.....	18
Abbildung 7:	Validierungsexperiment	20
Abbildung 8:	Plasmakonzentrationen von TFPI-Xa, F1+2, IL-8 und IL-6 bei stabiler Angina pectoris (SAP) und akutem Myokardinfarkt (AMI)....	25
Abbildung 9:	Zeitverläufe von TFPI-Xa, F1+2, IL-8 und IL-6 im AMI	26
Abbildung 10:	Korrelationen zwischen TFPI-Xa bzw. F1+2 und IL-8 im akuten Myokardinfarkt vor Intervention	27
Abbildung 11:	Dosisabhängige Steigerung der Freisetzung von IL-8, MCP-1 und IL-6 sowie der Expression von ICAM-1 durch FXa bei Endothelzellen.....	29
Abbildung 12:	Zeitabhängige Steigerung der Freisetzung von IL-8, MCP-1 und IL-6 sowie der Expression von ICAM-1 durch FXa bei Endothelzellen.....	30
Abbildung 13:	Wirkung einer Thrombininhibition (Lepirudin) und FXa-Inhibition (MC53255) auf die FXa-induzierte IL-8 Freisetzung.....	31
Abbildung 14:	Zytokinproduktion nach FXa Stimulation in Endothelzellen	32
Abbildung 15:	ICAM-Dichte auf Endothelzellen ohne (blau) und mit (rot) Stimulation mit FXa (Beispiel)	33
Abbildung 16:	Zytokinproduktion nach FXa Stimulation in mononukleären Zellen ..	34
Abbildung 17:	Stimulation von Endothelzellen mit FXa (rot) und FVIIa (gelb); IL-1 β (grün) als Positivkontrolle, unstimulierte Zellen (pink und grün rechts) als Negativkontrollen	35
Abbildung 18:	Effekte von FXa sowie der PAR-1 und PAR-2 agonistischen Peptide auf die Freisetzung von IL-8, MCP-1 und IL-6 sowie der Expression von ICAM-1 bei Endothelzellen.....	37

Abbildung 19: Effekte von FXa sowie der PAR-1 und PAR-2 agonistischen Peptide auf die Freisetzung von IL-8, MCP-1 und IL-6 bei Endothelzellen	38
Abbildung 20: Wirkung einer PAR-1 (ATAP2)- und PAR-2 (YFLLRN)-Inhibition auf die FXa-induzierte IL-8 Freisetzung.....	39

6.3 Tabellen

Tabelle 1: Beispiele von Expressionsort, Effekt und Aktivatoren der Protease-aktivierten Rezeptoren	10
Tabelle 2: PCR Ansatz	21
Tabelle 3: PCR Programmierung.....	22
Tabelle 4: Charakteristika der Patientengruppen	24
Tabelle 5: Korrelationen zwischen TFPI-Xa und IL-6 im akuten Myokardinfarkt	27

6.4 Literatur

- 1 Antman, E. M., McCabe, C. H., Gurfinkel, E. P., Turpie, A. G., Bernink, P. J., Salein, D., Bayes De Luna, A., Fox, K., Lablanche, J. M., Radley, D., Premmereur, J., Braunwald, E.
Enoxaparin prevents death and cardiac ischemic events in unstable angina/non-Q-wave myocardial infarction. Results of the thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) 11B trial
Circulation 100 (1999) 1593-1601
- 2 Applied Biosystems
User Bulletin #2
Relative Quantitation of Gene Expression
ABI Prism 7700 Sequence Detection System, 2001
- 3 Ardissino, D., Merlini, P. A., Gamba, G., Barberis, P., Demicheli, G., Testa, S., Colombi, E., Poli, A., Fetiveau, R., Montemartini, C.
Thrombin activity and early outcome in unstable angina pectoris
Circulation 93 (1996) 1634-1639
- 4 Asokanathan, N., Graham, P. T., Fink, J., Knight, D. A., Bakker, A. J., McWilliam, A. S., Thompson, P. J., Stewart, G. A.
Activation of protease-activated receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 stimulates IL-6, IL-8, and prostaglandin E2 release from human respiratory epithelial cells
J Immunol 168 (2002) 3577-3585
- 5 Aukrust, P., Berge, R. K., Ueland, T., Aaser, E., Damas, J. K., Wikeby, L., Brunsvig, A., Muller, F., Forfang, K., Froland, S. S., Gullestad, L.
Interaction between chemokines and oxidative stress: possible pathogenic role in acute coronary syndromes
J Am Coll Cardiol 37 (2001) 485-491
- 6 Barrett, T. D., Hennen, J. K., Marks, R. M., Lucchesi, B. R.
C-reactive-protein-associated increase in myocardial infarct size after ischemia/reperfusion
J Pharmacol Exp Ther 303 (2002) 1007-1013

- 7 Biasucci, L. M., Liuzzo, G., Fantuzzi, G., Caligiuri, G., Rebuffi, A. G., Ginnetti, F., Dinarello, C. A., Maseri, A.
Increasing levels of interleukin (IL)-1Ra and IL-6 during the first 2 days of hospitalization in unstable angina are associated with increased risk of in-hospital coronary events
Circulation 99 (1999) 2079-2084
- 8 Biasucci, L. M., Liuzzo, G., Grillo, R. L., Caligiuri, G., Rebuffi, A. G., Buffon, A., Summaria, F., Ginnetti, F., Fadda, G., Maseri, A.
Elevated levels of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability
Circulation 99 (1999) 855-860
- 9 Biasucci, L. M., Vitelli, A., Liuzzo, G., Altamura, S., Caligiuri, G., Monaco, C., Rebuffi, A. G., Ciliberto, G., Maseri, A.
Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina
Circulation 94 (1996) 874-877
- 10 Blackhart, B. D., Emilsson, K., Nguyen, D., Teng, W., Martelli, A. J., Nystedt, S., Sundelin, J., Scarborough, R. M.
Ligand cross-reactivity within the protease-activated receptor family
J Biol Chem 271 (1996) 16466-16471
- 11 Bogdanov, V. Y., Balasubramanian, V., Hathcock, J., Vele, O., Lieb, M., Nemerson, Y.
Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein
Nat Med 9 (2003) 458-462
- 12 Camerer, E., Huang, W., Coughlin, S. R.
Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa
Proc Natl Acad Sci U S A 97 (2000) 5255-5260

- 13 Camerer, E., Kataoka, H., Kahn, M., Lease, K., Coughlin, S. R.
Genetic evidence that protease-activated receptors mediate factor Xa signaling in endothelial cells
J Biol Chem 277 (2002) 16081-16087
- 14 Carr, C., Bild, G. S., Chang, A. C., Peer, G. T., Palmier, M. O., Frazier, R. B., Gustafson, M. E., Wun, T. C., Creasey, A. A., Hinshaw, L. B., et al.
Recombinant E. coli-derived tissue factor pathway inhibitor reduces coagulopathic and lethal effects in the baboon gram-negative model of septic shock
Circ Shock 44 (1994) 126-137
- 15 Danesh, J., Collins, R., Appleby, P., Peto, R.
Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies
Jama 279 (1998) 1477-1482
- 16 de Winter, R. J., Bholasingh, R., Lijmer, J. G., Koster, R. W., Gorgels, J. P., Schouten, Y., Hoek, F. J., Sanders, G. T.
Independent prognostic value of C-reactive protein and troponin I in patients with unstable angina or non-Q-wave myocardial infarction
Cardiovasc Res 42 (1999) 240-245
- 17 Dery, O., Corvera, C. U., Steinhoff, M., Bunnett, N. W.
Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases
Am J Physiol 274 (1998) C1429-1452
- 18 Dibra, A., Mehilli, J., Schwaiger, M., Schühlen, H., Bollwein, H., Braun, S., Neverve, J., Schömig, A., Kastrati, A.
Predictive value of basal C-reactive protein levels for myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction is dependent on the type of reperfusion treatment
Eur Heart J 24 (2003) 1128-1133

- 19 Dinarello, C. A., Gelfand, J. A., Wolff, S. M.
Anticytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome
Jama 269 (1993) 1829-1835
- 20 Erlich, J. H., Boyle, E. M., Labriola, J., Kovacich, J. C., Santucci, R. A., Fearn, C., Morgan, E. N., Yun, W., Luther, T., Kojikawa, O., Martin, T. R., Pohlman, T. H., Verrier, E. D., Mackman, N.
Inhibition of the tissue factor-thrombin pathway limits infarct size after myocardial ischemia-reperfusion injury by reducing inflammation
Am J Pathol 157 (2000) 1849-1862
- 21 Ernoffsson, M., Strekerud, F., Toss, H., Abildgaard, U., Wallentin, L., Siegbahn, A.
Low-molecular weight heparin reduces the generation and activity of thrombin in unstable coronary artery disease
Thromb Haemost 79 (1998) 491-494
- 22 Förster, T.
Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz.
In: "Annalen der Physik", Leipzig, 1948, 2, 55-75
- 23 FRISC, study group
Low-molecular-weight heparin during instability in coronary artery disease, Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease (FRISC) study group
Lancet 347 (1996) 561-568
- 24 Giugliano, G. R., Giugliano, R. P., Gibson, C. M., Kuntz, R. E.
Meta-analysis of corticosteroid treatment in acute myocardial infarction
Am J Cardiol 91 (2003) 1055-1059
- 25 Gouin-Thibault, I., Dewar, L., Craven, S., Kulczycky, M., Wun, T. C., Oforu, F. A.
Probable regulation of factor VIIa-tissue factor and prothrombinase by factor Xa-TFPI and TFPI in vivo
Br J Haematol 95 (1996) 738-746

- 26 Hamilton, J. R., Frauman, A. G., Cocks, T. M.
Increased expression of protease-activated receptor-2 (PAR2) and PAR4 in human coronary artery by inflammatory stimuli unveils endothelium-dependent relaxations to PAR2 and PAR4 agonists
Circ Res 89 (2001) 92-98
- 27 Haverkate, F., Thompson, S. G., Pyke, S. D., Gallimore, J. R., Pepys, M. B.
Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group
Lancet 349 (1997) 462-466
- 28 Hisama, N., Yamaguchi, Y., Okajima, K., Uchiba, M., Murakami, K., Mori, K., Yamada, S., Ogawa, M.
Anticoagulant pretreatment attenuates production of cytokine-induced neutrophil chemoattractant following ischemia-reperfusion of rat liver
Dig Dis Sci 41 (1996) 1481-1486
- 29 Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., Gelfand, D. H.
Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase
Proc Natl Acad Sci U S A 88 (1991) 7276-7280
- 30 Hollenberg, M. D., Saifeddine, M., al-Ani, B., Kawabata, A.
Proteinase-activated receptors: structural requirements for activity, receptor cross-reactivity, and receptor selectivity of receptor-activating peptides
Can J Physiol Pharmacol 75 (1997) 832-841
- 31 Iversen, N., Lindahl, A. K., Abildgaard, U.
Elevated plasma levels of the factor Xa-TFPI complex in cancer patients
Thromb Res 105 (2002) 33-36
- 32 Lagrand, W. K., Visser, C. A., Hermens, W. T., Niessen, H. W., Verheugt, F. W., Wolbink, G. J., Hack, C. E.
C-reactive protein as a cardiovascular risk factor: more than an epiphenomenon?
Circulation 100 (1999) 96-102

- 33 Langer, F., Morys-Wortmann, C., Kusters, B., Storck, J.
Endothelial protease-activated receptor-2 induces tissue factor expression and von Willebrand factor release
Br J Haematol 105 (1999) 542-550
- 34 Lerner, D. J., Chen, M., Tram, T., Coughlin, S. R.
Agonist recognition by proteinase-activated receptor 2 and thrombin receptor. Importance of extracellular loop interactions for receptor function
J Biol Chem 271 (1996) 13943-13947
- 35 Lindahl, B., Toss, H., Siegbahn, A., Venge, P., Wallentin, L.
Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease
N Engl J Med 343 (2000) 1139-1147
- 36 Lindmark, E., Diderholm, E., Wallentin, L., Siegbahn, A.
Relationship between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: effects of an early invasive or noninvasive strategy
Jama 286 (2001) 2107-2113
- 37 Liuzzo, G., Biasucci, L. M., Gallimore, J. R., Grillo, R. L., Rebuffi, A. G., Pepys, M. B., Maseri, A.
The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina
N Engl J Med 331 (1994) 417-424
- 38 Macfarlane, S. R., Seatter, M. J., Kanke, T., Hunter, G. D., Plevin, R.
Proteinase-activated receptors
Pharmacol Rev 53 (2001) 245-282
- 39 Mackman, N.
Regulation of the tissue factor gene
Faseb J 9 (1995) 883-889

- 40 Mallat, Z., Benamer, H., Hugel, B., Benessiano, J., Steg, P. G., Freyssinet, J. M., Tedgui, A.
Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes
Circulation 101 (2000) 841-843
- 41 Manduteanu, I., Voinea, M., Capraru, M., Dragomir, E., Simionescu, M.
A novel attribute of enoxaparin: inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells by a mechanism involving cell adhesion molecules
Pharmacology 65 (2002) 32-37
- 42 Marcus, R., Peritz, E. Gabriel, K.R.
On closed testing procedures with special reference to ordered analysis of variance
Biometrika 63 (1976) 655-660
- 43 Miyao, Y., Yasue, H., Ogawa, H., Misumi, I., Masuda, T., Sakamoto, T., Morita, E.
Elevated plasma interleukin-6 levels in patients with acute myocardial infarction
Am Heart J 126 (1993) 1299-1304
- 44 Montalescot, G., Bal-dit-Sollier, C., Chibedi, D., Collet, J. P., Soulat, T., Dalby, M., Choussat, R., Cohen, A., Slama, M., Steg, P. G., Dubois-Rande, J. L., Metzger, J. P., Tarragano, F., Guermonprez, J. L., Drouet, L.
Comparison of effects on markers of blood cell activation of enoxaparin, dalteparin, and unfractionated heparin in patients with unstable angina pectoris or non-ST-segment elevation acute myocardial infarction (the ARMADA study)
Am J Cardiol 91 (2003) 925-930
- 45 Moons, A. H., Levi, M., Peters, R. J.
Tissue factor and coronary artery disease
Cardiovasc Res 53 (2002) 313-325

- 46 Morrow, D. A., Rifai, N., Antman, E. M., Weiner, D. L., McCabe, C. H., Cannon, C. P., Braunwald, E.
C-reactive protein is a potent predictor of mortality independently of and in combination with troponin T in acute coronary syndromes: a TIMI 11A substudy. *Thrombolysis in Myocardial Infarction*
J Am Coll Cardiol 31 (1998) 1460-1465
- 47 Moss, A. J., Goldstein, R. E., Marder, V. J., Sparks, C. E., Oakes, D., Greenberg, H., Weiss, H. J., Zareba, W., Brown, M. W., Liang, C. S., Lichstein, E., Little, W. C., Gillespie, J. A., Van Voorhees, L., Krone, R. J., Bodenheimer, M. M., Hochman, J., Dwyer, E. M., Jr., Arora, R., Marcus, F. I., Watelet, L. F., Case, R. B.
Thrombogenic factors and recurrent coronary events
Circulation 99 (1999) 2517-2522
- 48 Neumann, F. J., Ott, I., Marx, N., Luther, T., Kenngott, S., Gawaz, M., Kotzsch, M., Schömig, A.
Effect of human recombinant interleukin-6 and interleukin-8 on monocyte procoagulant activity
Arterioscler Thromb Vasc Biol 17 (1997) 3399-3405
- 49 Neumann, F. J., Richardt, G., Schneider, M., Ott, I., Haupt, H. M., Tillmanns, H., Schömig, A., Rauch, B.
Cardiac release of chemoattractants after ischaemia induced by coronary balloon angioplasty
Br Heart J 70 (1993) 27-34
- 50 Nystedt, S., Ramakrishnan, V., Sundelin, J.
The proteinase-activated receptor 2 is induced by inflammatory mediators in human endothelial cells. Comparison with the thrombin receptor
J Biol Chem 271 (1996) 14910-14915

- 51 Ohkura, N., Soe, G., Kohno, I., Kumeda, K., Wada, H., Kamikubo, Y., Shiku, H., Kato, H.
Monoclonal antibody specific for tissue factor pathway inhibitor-factor Xa complex: its characterization and application to plasmas from patients with disseminated intravascular coagulation and pre-disseminated intravascular coagulation
Blood Coagul Fibrinolysis 10 (1999) 309-319
- 52 Okugawa, Y., Wada, H., Noda, T., Sakakura, M., Nakasaki, T., Watanabe, R., Deguchi, H., Gabazza, E. C., Mori, Y., Nishikawa, M., Deguchi, K., Nobori, T., Shiku, H.
Increased plasma levels of tissue factor pathway inhibitor-activated factor X complex in patients with disseminated intravascular coagulation
Am J Hematol 65 (2000) 210-214
- 53 Ott, I., Andrassy, M., Zieglgansberger, D., Geith, S., Schömig, A., Neumann, F. J.
Regulation of monocyte procoagulant activity in acute myocardial infarction: role of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor-1
Blood 97 (2001) 3721-3726
- 54 Ott, I., Neumann, F. J., Kenngott, S., Gawaz, M., Schömig, A.
Procoagulant inflammatory responses of monocytes after direct balloon angioplasty in acute myocardial infarction
Am J Cardiol 82 (1998) 938-942
- 55 Patterson, C., Stouffer, G. A., Madamanchi, N., Runge, M. S.
New tricks for old dogs: nonthrombotic effects of thrombin in vessel wall biology
Circ Res 88 (2001) 987-997
- 56 Ramachandran, R., Klufas, A. S., Molino, M., Ahuja, M., Hoxie, J. A., Brass, L. F.
Release of the thrombin receptor (PAR-1) N-terminus from the surface of human platelets activated by thrombin
Thromb Haemost 78 (1997) 1119-1124

- 57 Ridker, P. M., Cushman, M., Stampfer, M. J., Tracy, R. P., Hennekens, C. H.
Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men
N Engl J Med 336 (1997) 973-979
- 58 Ridker, P. M., Hennekens, C. H., Buring, J. E., Rifai, N.
C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women
N Engl J Med 342 (2000) 836-843
- 59 Ridker, P. M., Rifai, N., Stampfer, M. J., Hennekens, C. H.
Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men
Circulation 101 (2000) 1767-1772
- 60 Riewald, M., Kravchenko, V. V., Petrovan, R. J., O'Brien, P. J., Brass, L. F., Ulevitch, R. J., Ruf, W.
Gene induction by coagulation factor Xa is mediated by activation of protease-activated receptor 1
Blood 97 (2001) 3109-3116
- 61 Ross, R.
Atherosclerosis--an inflammatory disease
N Engl J Med 340 (1999) 115-126
- 62 Senden, N. H., Jeunhomme, T. M., Heemskerk, J. W., Wagenvoord, R., van't Veer, C., Hemker, H. C., Buurman, W. A.
Factor Xa induces cytokine production and expression of adhesion molecules by human umbilical vein endothelial cells
J Immunol 161 (1998) 4318-4324
- 63 Statistisches Bundesamt
"Statistisches Jahrbuch 2004"
Wiesbaden, 2004, 223-259

- 64 Toss, H., Lindahl, B., Siegbahn, A., Wallentin, L.
Prognostic influence of increased fibrinogen and C-reactive protein levels in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease
Circulation 96 (1997) 4204-4210
- 65 Vassallo, R. R., Jr., Kieber-Emmons, T., Cichowski, K., Brass, L. F.
Structure-function relationships in the activation of platelet thrombin receptors by receptor-derived peptides
J Biol Chem 267 (1992) 6081-6085
- 66 Vercellotti, G. M., van Asbeck, B. S., Jacob, H. S.
Oxygen radical-induced erythrocyte hemolysis by neutrophils. Critical role of iron and lactoferrin
J Clin Invest 76 (1985) 956-962
- 67 Wilcox, J. N., Smith, K. M., Schwartz, S. M., Gordon, D.
Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque
Proc Natl Acad Sci U S A 86 (1989) 2839-2843
- 68 Yamasaki, Y., Matsuo, Y., Matsuura, N., Onodera, H., Itoyama, Y., Kogure, K.
Transient increase of cytokine-induced neutrophil chemoattractant, a member of the interleukin-8 family, in ischemic brain areas after focal ischemia in rats
Stroke 26 (1995) 318-322; discussion 322-313

Marken- oder Firmenbezeichnungen können warenrechtlich geschützt sein, auch wenn ein Hinweis auf etwa bestehende Schutzrechte fehlt.

7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Franz-Josef Neumann möchte ich herzlich dafür danken, die Arbeit in seinem wissenschaftlichen Team beginnen zu können. Die Verbindung von klinischer und experimenteller Medizin war eine faszinierende und prägende Bereicherung meiner medizinischen Ausbildung.

Aufrichtig danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Albert Schömig nicht nur für die ausgezeichneten Voraussetzungen, wissenschaftliches Arbeiten zu erlernen, sondern auch besonders für die konstruktive Kritik zur Präsentation meiner Ergebnisse.

Ganz besonders danken möchte ich Frau PD Dr. Ilka Ott für die exzellente und unermüdliche Betreuung in allen Phasen dieser Arbeit sowie für ihre weit überdurchschnittliche Förderung, die mir ermöglichte, die Resultate dieser Arbeit einem anerkannten wissenschaftlichen Umfeld vorstellen zu können.

Sehr herzlich danken möchte ich auch Frau Birgit Campbell, Frau Christiane Donick und Frau Annette Stobbe für die geduldige Einarbeitung und ihre immer freundliche Hilfsbereitschaft bei den alltäglichen Problemen der Laborarbeit.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken für ihre aufopferungsvolle und bedingungslose Unterstützung und die Aufmunterungen, die die Fertigstellung dieser Arbeit vorangetrieben haben.