

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Hubertus Wald Tumorzentrum
Universitäres Cancer Center Hamburg (UCCH)

Klinikdirektor: Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer

Bedeutung der Proteindisulfidisomerase für die Aktivität des Tissue Factor auf AML-Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Cornelia Fischer

Hamburg 2013

angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am 11.06.2014

**Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg.**

Prüfungsausschuss, Vorsitzender: PD Dr. med. Florian Langer

Prüfungsausschuss, erster Gutachter: Prof. Dr. med. Reinhard Schneppenheim

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	Seite 1
1.1. Gerinnungsstörungen bei AML-Patienten	1
1.2. Tissue Factor	2
1.2.1. Struktur	2
1.2.2. Vorkommen	3
1.2.3. Funktion	5
1.2.4. Klinische Relevanz	6
1.3. Mechanismen der Tissue Factor-Aktivierung	6
1.4. Das Enzym Proteindisulfidisomerase	10
1.4.1. Vorkommen, Struktur und Funktion der Proteindisulfidisomerase	10
1.4.2. Inhibitoren der Proteindisulfidisomerase	12
1.4.2.1. Rutin	12
1.4.2.2. Bacitracin	13
1.5. Fragestellung	14
2. Materialien und Methoden	15
2.1. Zellkultur	15
2.2. Untersuchung des Einflusses von Inhibitoren der PDI auf die prokoagulatorische Aktivität des TF auf myeloblastischen Zellen	16
2.2.1. Vorbereitung	16
2.2.1.1. Mediumaustausch	16
2.2.1.2. Einstellen der Zellzahl	16
2.2.2. Inkubation	16
2.2.3. Messung der Gerinnungszeit am Kugelkoagulometer	17
2.2.4. Messung der TF-PCA in einer Zellsuspension	18
2.3. Untersuchung des Einflusses von Inhibitoren der PDI auf die TF-abhängige prokoagulatorische Aktivität auf Mikropartikeln	18
2.4. Bestimmung des Anteils an apoptotischen Zellen in einer Suspension	19
2.5. Semiquantitative Bestimmung von TF und PDI auf der Zelloberfläche	20
2.6. Quantitative Bestimmung des gesamten zellulären TF	21
2.7. Charakterisierung von Rutin und Bacitracin als Inhibitoren der PDI	21
2.8. Nachweis von PDI-Aktivität auf der Zelloberfläche	22

3.	Ergebnisse	23
3.1.	Hemmung der Aktivität rekombinanter PDI durch kleinmolekulare Substanzen	23
3.1.1.	Hemmung rekombinanter PDI durch Rutin	23
3.1.2.	Hemmung rekombinanter PDI durch Bacitracin	24
3.2.	Nachweis von TF auf HL60- und THP1-Zellen	24
3.3.	Nachweis von PDI auf HL60- und THP1-Zellen	25
3.4.	Nachweis von PDI-Aktivität auf der Oberfläche von HL60-Zellen	27
3.5.	Veränderungen auf HL60-Zellen nach 20-minütiger Inkubation mit PDI-Inhibitoren	29
3.6.	Veränderungen auf HL60-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit PDI-Inhibitoren	31
3.6.1.	Entwicklung der Zellzahl	31
3.6.2.	Zellassoziierte TF-PCA	32
3.6.3.	MP-assoziierte TF-PCA	33
3.6.4.	Externalisierung von PS	33
3.6.5.	Zeitlicher Verlauf der Veränderungen durch PDI-Inhibitoren	36
3.6.6.	Quantitative Bestimmung von TF auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie	38
3.6.7.	Quantitative Bestimmung des insgesamten TF-Gehalts der Zellen mittels ELISA	43
3.6.8.	Ergebnisse eines Versuchs mit Myeloblasten eines AML-Patienten	44
3.7.	Veränderungen auf THP-1-Zellen nach Inkubation mit PDI-Inhibitoren	45
3.7.1.	Veränderungen der TF-Aktivität durch Inkubation mit Rutin oder Bacitracin allein	45
3.7.2.	Wirkung von Daunorubicin auf THP1-Zellen	46
3.7.3.	Veränderungen durch eine Coinkubation von Daunorubicin und Rutin	48
3.7.4.	Ergebnisse eines Versuchs mit Myeloblasten eines AML-Patienten	50
4.	Diskussion	52
4.1.	Zusammenfassung und Beurteilung	52
4.1.1.	PDI-Aktivität auf der Zelloberfläche	52
4.1.2.	Veränderungen nach Hemmung der PDI	54
4.1.3.	Vergleich der Wirkung von Bacitracin und Rutin	55
4.1.4.	Diskrepanz zwischen den Auswirkungen nach lang- und kurzfristiger	

Inkubation mit PDI-Inhibitoren	56
4.2. Schlussfolgerungen auf den Mechanismus der TF-Aktivierung	57
4.2.1. Hintergründe erhöhter TF-vermittelter PCA	57
4.2.2. Regulierung der TF-Aktivität durch die PDI	59
4.2.3. Regulierung der TF-Aktivität durch PS-Externalisierung	60
4.2.4. Einfluss der PDI auf die TF-Aktivität auf THP1-Zellen	62
4.3. Abschließende Beurteilung	63
5. Zusammenfassung	65
6. Abkürzungsverzeichnis	67
7. Literaturverzeichnis	68
8. Danksagung	72
9. Lebenslauf	78
10. Eidesstattliche Erklärung	79

1. Einleitung

1.1. Gerinnungsstörungen bei AML-Patienten

Unter der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) versteht man eine Störung der Hämatopoese im Knochenmark, der eine maligne Entartung von Myeloblasten zugrunde liegt. Es kommt daraufhin zu einer unkontrollierten Proliferation und Ausschwemmung der unreifen Blasten in die Blutbahn. Patienten mit einer AML unterliegen einem erhöhten Risiko für systemische Gerinnungsstörungen. Es besteht nicht nur eine hämorrhagische Diathese, die durch die Thrombozytopenie und die fehlerhafte Ausreifung der Thrombozyten bei Knochenmarksinsuffizienz zu erklären ist (Webert et al. 2006), sondern auch thromboembolische Komplikationen prägen häufig das Krankheitsbild. Fall-Kontroll-Studien belegen eine vierfach erhöhte Inzidenz thromboembolischer Ereignisse bei Patienten mit akuten Leukämien (Khorana et al. 2006). Diese können im Schweregrad variieren, die Manifestationen reichen von der lokalen Thrombose bis hin zur Disseminierten Intravasalen Gerinnung (DIC). Zwar sind diese thromboembolischen Ereignisse meist venöser Genese, es wurden jedoch auch schon Fälle von arteriellen Thromboembolien im Zusammenhang mit der AML beschrieben (Kwaan 2007).

Die AML ist eine heterogene Erkrankung und wird anhand von morphologischen, immunphänotypischen und genetischen Kriterien klassifiziert. Eine gebräuchliche Einteilung ist die French American British (FAB) Classification, die sich vor allem nach der Morphologie der Myeloblasten richtet. Patienten mit einer AML vom Subtyp M3 (Akute Promyelozytäre Leukämie) sind von thromboembolischen Komplikationen besonders häufig betroffen (Stefano et al. 2005).

Thromboembolische Komplikationen manifestieren sich oft früh im Krankheitsverlauf (Kwaan 2007), was zeigt, dass der prothrombotische Zustand schon in den anfänglichen Stadien der AML vorliegt.

Eine Behandlungsoption der AML ist eine zytotoxische Chemotherapie, die eine komplette Remission herbeiführen soll. Hier kommt am häufigsten das TAD-Regime mit Thioguanin, ARA-C und Daunorubicin zum Einsatz. Die Gerinnungsstörungen treten oft zeitgleich mit der Einleitung einer Chemotherapie in Erscheinung (Dixit et al. 2007), was für diese Arbeit von besonderer Relevanz ist.

Laboranalytisch lässt sich bei diesen Patienten ein Ungleichgewicht aus

prokoagulatorischen, hyperfibrinolytischen (z.B. uPA, tPA, uPA-Rezeptor, Annexin II) und unspezifisch proteolytischen Parametern (z.B. leukozytäre Elastase) nachweisen (Barbui et al. 2001). Bei den prokoagulatorischen Parametern steht eine Überexpression des Tissue Factor (TF) auf AML-Zellen im Vordergrund (Nadir et al. 2005).

Besonders auf leukämischen Blasten von Patienten mit klinisch bedeutsamen Gerinnungsstörungen konnten erhöhte Mengen an TF nachgewiesen werden (Tanaka et Yaminishi, 1993), was für eine Schlüsselrolle des TF bei diesen Komplikationen spricht. Dazu passt auch der Nachweis, dass AML-M3-Zellen über eine vergleichsweise hohe TF-Expression (Barbarroja et al. 2007) und TF-assoziierte prokoagulatorische Aktivität (PCA, Tanaka et Yamanishi 1993) verfügen. Signifikant erhöhte Mengen an TF wurden in solchen Fällen aber nicht nur direkt auf den Zellen gefunden, sondern auch auf von Krebszellen generierten sogenannten Mikropartikeln (Langer et al. 2008).

Da thromboembolische Erkrankungen mit einer signifikant schlechteren Prognose einhergehen, ist ein genaues Verständnis des zugrunde liegenden Pathomechanismus nötig, um neue Strategien zur Prophylaxe und Therapie dieser oft lebensbedrohlichen Komplikationen zu entwickeln.

1.2. Tissue Factor

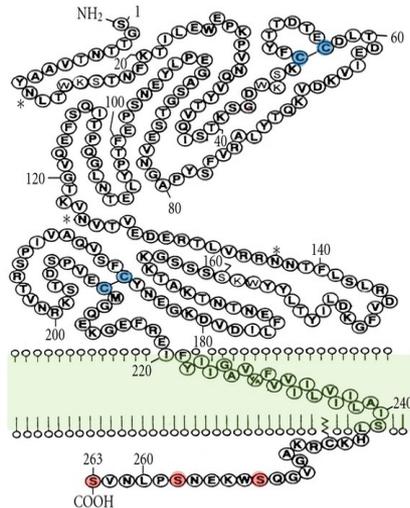
1.2.1. Struktur

TF ist ein Glykoprotein von 47 kDa und wird auch als Gewebsthrombokinase, Thromboplastin oder Faktor III bezeichnet. Er verfügt über eine zytoplasmatische, eine transmembranöse und eine extrazelluläre Domäne und besteht insgesamt aus 263 Aminosäuren. Seine Kodierung erfolgt von einer 12,4 kbp langen Genregion auf Chromosom 1 an Position p21-22 (Ruf et Edgington, 1994).

In der extrazellulären Domäne befindet sich die Bindungsstelle für den Gerinnungsfaktor VII (Chu 2011). Für diese Arbeit von besonderem Interesse sind zwei hier befindlichen Cystein-Paare, die sich potentiell über Disulfidbrücken miteinander verknüpfen können. Die eine befindet sich nah am N-Terminus zwischen Cys⁴⁹ und Cys⁵⁷, die andere liegt weiter membranproximal zwischen Cys¹⁸⁶ und Cys²⁰⁹. Die Disulfidbrücke zwischen Cys¹⁸⁶ und Cys²⁰⁹ ist zur Stabilisierung der Interaktion mit Faktor VIIa notwendig (Rehemtulla et al.

1991).

Im relativ kleinen zytoplasmatischen Teil ist TF über Thioester an den Membranlipiden Stearinsäure und Palmitinsäure verankert. In dieser Domäne befinden sich Serine, bei deren Phosphorylierung intrazelluläre Signalkaskaden angestoßen werden können (Ruf et Edgington 1994).



Diese Grafik entstammt einer Arbeit von Chu von 2011. Dargestellt ist der TF als Transmembranprotein. Die extrazellulären Cysteine sind farblich hervorgehoben.

1.2.2. Vorkommen

Es gibt eine Vielzahl von Zelltypen, die TF synthetisieren können. Konstitutiv wird er vor allem im extravaskulären Raum von subendothelialen Zellen wie Fibroblasten und glatten Muskelzellen gebildet, so dass er nach Kontakt mit Blut durch eine Verletzung für eine rasche Abdichtung der Gefäßwand sorgen kann (Fleck et al. 1990).

In unterschiedlichem Maße wird TF auch von organspezifischen Zellen exprimiert. Østerud und Bjørklid fanden 2006 große Mengen von TF in stark vaskularisiertem Gewebe wie Plazenta, Lunge und Gehirn, mäßig große Mengen TF in Herz, Gastrointestinaltrakt, Niere, Hoden und Uterus und sehr geringe Mengen in Milz, Leber und Thymus.

In der Vergangenheit herrschte die Annahme vor, dass TF unter physiologischen Bedingungen nicht in direkten Kontakt mit dem Blut gerät. Heute weiß man jedoch, dass es auch im Blut zirkulierende Zellen gibt, die TF exponieren, wenn auch in viel geringerem Maße als extravaskuläre Zellen (Drake et al. 1989).

Seit 1975 ist durch Rivers et al. bekannt, dass Endotoxin-stimulierte Monozyten TF synthetisieren können. Auf diesen Zellen, die zytologisch mit den in dieser Arbeit

verwendeten Zelllinien eng verwandt sind (siehe 2.1.), lässt sich die TF-Expression durch spezifische Botenstoffe induzieren. Zu diesen Botenstoffen zählen inflammatorische Stimuli wie Endotoxine (Gregory et al. 1989), Phorbol ester (Rana et al. 1988), C-reaktives Protein (Cermak et al. 1993), Zytokine wie TNF α (Conkling et al. 1981) und IL-1 (Herbert et al. 1992). Die TF-Genexpression in Monozyten lässt sich auch durch Transkriptionsfaktoren wie NF κ B oder EGF-1 steuern (Mackman et al. 1991).

Aber auch andere Zellen der myeloischen Reihe können TF exprimieren. Osterud et al. (2000) konnten auf neutrophilen Granulozyten zwar selbst nach einer Stimulation keinen TF nachweisen, einer Arbeit von Maugeri et al. (2006) zufolge können jedoch auch diese Zellen unter bestimmten inflammatorischen Bedingungen TF bilden. Vergleicht man die Zellen der myeloischen Reihe untereinander, so findet man unter physiologischen Bedingungen ohne exogene Stimulation den höchsten TF-Gehalt in eosinophilen Granulozyten, die in ihren spezifischen Granula auch TF speichern (Reinhardt 2007).

Thrombozyten sind als intravaskuläre TF-Quellen zwar umstritten, es hat aber auch erfolgreiche Nachweise von TF auf der Oberfläche der Thrombozyten gegeben (Zillmann et al. 2001). Laut einer Studie von Escolar et al. (2008) müssen Thrombozyten TF jedoch zuvor durch Internalisierung von TF-positiven Mikrovesikeln aufnehmen.

Von Bogdanov et al. wurde 2003 eine alternativ gesplizierte Variante von TF identifiziert (alternatively spliced human TF, asHTF). Dieser TF-Variante fehlt ein Teil der Transmembrandomäne und am N-Terminus befindet sich eine abweichende Peptidsequenz. AsHTF soll im Blut zirkulieren und zum appositionellen Wachstum eines Thrombus beitragen.

In zahlreichen Studien werden eine ausschließlich oberflächliche Lokalisation des TF angezweifelt und darüber hinaus intrazelluläre TF-Bestände postuliert. Hierzu liegen unterschiedliche Angaben für die einzelnen Zelltypen vor. In Fibroblasten konnten Mandal et al. 2006 nachweisen, dass der zytosolische Pool sogar die Mehrheit des gesamten zellulären TF ausmacht. In besonders hoher Konzentration konnte TF in dieser Arbeit im Golgi-Apparat gefunden werden. Auch in Lysosomen und Endosomen war TF nachweisbar, das Endoplasmatische Retikulum dagegen scheint bei der TF-Speicherung keine nennenswerte Rolle zu spielen. Der intrazellulär gefundene TF erwies sich allerdings als funktionell inaktiv. Drake et al. vertraten 1989 nach der Untersuchung von Monozyten jedoch die These, dass potentiell aktiver TF sich hier ausschließlich auf der Oberfläche befindet. Mit dieser Aussage stützen sich die Autoren zum einen auf eine immunoelektronenmikroskopische Analyse und zum anderen auf die Beobachtung, dass nach einer Blockierung des oberflächlichen TF auch

nach einer Zellyse keine TF-Aktivität mehr messbar war.

Eine hohe Dichte an TF findet sich auf Mikropartikeln (MPs), die daher über ein besonders hohes prokoagulatorisches Potential verfügen. Unter MPs werden $<1\ \mu\text{m}$ durchmessende Membranfragmente verstanden, die von gewissen Zellen, vor allem Monozyten, Thrombozyten und Endothelzellen, auf bestimmte Stimuli hin oder im Rahmen der Apoptose durch proteolytische Spaltung des Zytoskeletts aus der Plasmamembran abgeschnürt werden (Owens et Mackman 2011). Eine charakteristische Eigenschaft maligner Zellen ist es, diese MPs auch konstitutiv in den Blutkreislauf freizusetzen (Haubold et al. 2009, Langer et al. 2008). Die Ausschüttung von MPs soll durch Stimulation des P2X7-Rezeptors über ATP auslösbar sein (Furlan-Freguia et al. 2011).

1.2.3. Funktion

Die primäre physiologische Funktion des TF besteht darin, die extrinsische Gerinnung anzustoßen und so eine nach mechanischer Verletzung auftretende Blutung zu stillen (Chu 2011). Über Bindung an seinen Liganden Faktor VII initiiert er zu diesem Zweck die Gerinnungskaskade, an deren Ende die Bildung von Fibrin steht.

Der Formation des TF-Faktor VII-Komplexes geht die proteolytische Aktivierung von Faktor VII, einer Serin-Protease, zum aktiven Faktor VIIa voraus. Durch den aktiven Faktor VIIa kommt es autokatalytisch zu einer Aktivierung weiterer Faktor VII-Moleküle, was zu einer Amplifikation und Beschleunigung der gesamten Gerinnungskaskade beiträgt (Bach 1988). Der Komplex aus TF und Faktor VIIa kann dann proteolytisch die nachgeschalteten Gerinnungsfaktoren IX und X aktivieren, so dass es unter Beteiligung von Kalzium und anionischen Phospholipiden zu einer Spaltung von Prothrombin in Thrombin kommt, was seinerseits Fibrinogen in Fibrin umwandelt. Durch Polymerisierung der Fibrin-Moleküle entsteht das Gerinnsel zur Abdichtung des Gefäßes (Nemerson 1988).

Diese entscheidende Rolle bei der Gerinnung hat dem TF schon die Bezeichnung „Primaballerina“ eingetragen (Rapaport et Rao 1995). Der TF-Faktor VIIa-Komplex ist aber nicht nur für die Gerinnung wichtig, sondern soll durch Stimulation G-Protein-gekoppelter, durch Proteasen aktivierbarer Rezeptoren (PAR) auch in inflammatorische Prozesse involviert sein (Langer et Bokemeyer 2012).

Wie in zahlreichen unabhängigen Studien aufgezeigt wurde, ist TF möglicherweise direkt an der Entstehung und Progression von Tumoren beteiligt. Während der Mutation von

Tumorsuppressorgenen und Protoonkogenen soll es zugleich auch zu einer Induktion der TF-Expression kommen (Rak et al. 2006). TF ist demnach Bestandteil der für maligne Zellen typischen Biologie. Daneben wird dem TF-Faktor VIIa-Komplex eine Rolle bei der Metastasierung und Angiogenese von Tumoren zugeschrieben (Versteeg et al 2004, Langer et Bokemeyer 2012).

1.2.4. Klinische Relevanz

Thromboembolische und hämorrhagische Komplikationen zählen zu den häufigsten Todesursachen bei AML-Patienten mit einer besonders hohen Prävalenz bei der Untergruppe der Akuten Promyelozytären Leukämie (M3). Neben den etablierten Risikofaktoren der Thrombozytopenie und Hyperleukozytose scheint die Neigung zur gesteigerten prokoagulatorischen Aktivität und Hyperfibrinolyse durch eine Überexpression des TF auf den Blasten und besonders den oben beschriebenen MPs bedingt zu sein (Ma et al. 2013). Bei der Suche nach prophylaktischen Möglichkeiten zur Vermeidung dieser Komplikationen rückt die Bedeutung des TF daher mehr und mehr in den Vordergrund.

TF wird auch mit thromboembolischen Komplikationen bei anderen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht. Neben der hier thematisierten AML ist seine Bedeutung auch beispielsweise für gramnegative Sepsis mit Schock (Østerud et Flaegstad 1983) und Arteriosklerose (Crawley et al. 2000) dokumentiert.

Wegen der Überexpression von TF auf malignen Zellen, wie sie unter anderem bei dem Ovariakarzinom (Uno et al 2007), dem Mammakarzinom (Ueno et al. 2000) und dem Prostatakarzinom (Kaushal 2008) registriert wurde, gibt es inzwischen den Vorschlag, TF als Biomarker für Krebserkrankungen zu nutzen (Förster et al. 2006).

Erhöhte TF-Werte sind darüber hinaus bei Adipositas (Samad et al. 2001) und Diabetes (Carr 2001) beschrieben, was den hyperkoagulablen Zustand bei diesen Patienten mit begünstigt.

1.3. Mechanismen der TF-Aktivierung

In der Vergangenheit wurde vielfach gezeigt, dass TF auf der Zelloberfläche nicht ausschließlich in seiner aktiven Form vorliegt. In der Mehrzahl befindet er sich in einem

sogenannten kryptischen Zustand, aus dem heraus er einer Aktivierung bedarf, um sein volles prokoagulatorisches Potential entfalten zu können (Maynard et al. 1975). So lässt sich erklären, dass TF-exponierende Zellen im Blut zirkulieren, ohne jedoch die Gerinnung anzustoßen.

Auf der Oberfläche dieser Zellen existieren also mindestens zwei funktionell voneinander abzugrenzende Subpopulationen des TF: die als aktiv bezeichnete Form, die ~20% des gesamten TF ausmacht und von der die gesamte prokoagulatorische Aktivität ausgeht, und die kryptische Subpopulation von ~80%, die für die Gerinnung ohne Bedeutung ist, solange die entsprechenden Stimuli ausbleiben (Le et al. 1992).

Für die Formation des TF-Faktor VIIa-Komplexes ist keine vorausgehende Aktivierung erforderlich. Die Verfügbarkeit von Bindungsstellen für Faktor VII stellt auch nicht den limitierenden Faktor dar (Le et al. 1992). Faktor VIIa kann sowohl an kryptischen wie auch an aktiven TF binden, jedoch nur der Komplex mit aktivem TF kann den Faktor X spalten und so prokoagulatorisch wirksam sein (Bach 2006).

Wie der Prozess dieser Aktivierung vonstatten geht, ist nicht abschließend geklärt. Unbekannt sind sowohl der genaue Mechanismus der Aktivierung als auch die Frage, worin sich aktiver und kryptischer TF strukturell voneinander unterscheiden. Während die übrigen Gerinnungsfaktoren über limitierte Proteolyse in ihre aktive Form überführt werden, wird der TF durch proteolytische Spaltung weder inaktiviert noch aktiviert (Bach 1988).

Es sind jedoch vielerlei Stimuli beschrieben, die eine solche Umwandlung von kryptischem zu aktivem TF herbeiführen können. Hierzu zählen beispielsweise Zelllyse durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen, Apoptoseinduktion durch Chemotherapie oder Behandlung mit einem Calciumionophor. Nach all diesen Maßnahmen konnte in variablem Ausmaß eine Erhöhung der TF-assoziierten prokoagulatorischen Aktivität (PCA) gemessen werden (Bach 2006).

In dieser Arbeit sollte zu diesem Zweck das Chemotherapeutikum Daunorubicin (DNR) zum Einsatz kommen, das durch Interkalation zwischen den Basen der DNA eine Apoptose der Zelle auslösen kann. In anderen Arbeiten (z.B. Langer et al. 2004) hat sich DNR in diesem Zusammenhang als wirksam erwiesen.

Gemeinsam ist all den oben genannten Maßnahmen, dass unter ihnen die Struktur einer intakten Zelle und damit die physiologische Assymetrie der Membranphospholipide verloren geht. Infolgedessen kommt es nachweislich zu einer Verlagerung des negativ geladenen, gerinnungsaktiven Phospholipids Phosphatidylserin (PS) von der inneren auf die äußere Schicht der doppellagigen Zellmembran (Bach 2006).

Zwischen der Externalisierung von PS und der TF-Aktivierung wird daher ein ursächlicher Zusammenhang vermutet (Greeno et al. 1996). Durch welchen Mechanismus eine PS-Externalisierung die Konversion des TF in seine aktive Form bewerkstelligen könnte, ist jedoch nicht abschließend gesichert. Bach und Moldow stellten 1997 die Hypothese auf, dass elektrostatische Interaktionen zwischen Lys¹⁶⁵/Lys¹⁶⁶ des TF einerseits und dem polaren Kopf des PS andererseits die TF-Konformation verändern können und infolgedessen die Bindung des Faktor X schneller möglich ist. Ob die PS-Externalisierung für die TF-Aktivierung ein grundsätzlich notwendiges oder nur ein verstärkendes, jedoch nicht hinreichendes Ereignis ist, wird derzeit kontrovers diskutiert.

Eine abnorm hohe PS-Expression konnte auf verschiedenen pathologischen Zelltypen, z.B. Erythrozyten von Patienten mit Sichelzellanämie (Wood et al. 1996), β -Thalassämie (Ruf et al. 1997) oder Urämie (Bonomini et al. 1999), viral, z.B. durch CMV (Van Dam-Mieras et al. 1987), oder bakteriell, z.B. durch *Chlamydia pneumoniae* (Goth et Stephens 2001) infizierten Zellen oder malignen Tumorzellen (Utsugi et al. 1999), nachgewiesen werden. Da diese Krankheitsbilder mit thromboembolischen Komplikationen einher gehen können, wurde von Zwaal et al. 2001 geschlossen, dass diese erhöhte Gerinnungsneigung zumindest teilweise durch die abnorme Expression von PS auf der Zelloberfläche bedingt sein könnte.

In einigen Arbeiten werden auch PS-unabhängige Mechanismen der TF-Aktivierung vorgeschlagen.

TF gehört einer Superfamilie von Zytokin-Rezeptoren an, die grundsätzlich zur Dimerisierung neigen (Kossiakoff et al. 1994). Es fanden sich Hinweise darauf, dass der inaktive Zustand mit einer solchen Selbstassoziation von TF zusammenhängt. Demnach liegt TF in kryptischer Form als Homodimer oder -oligomer vor, was dazu führt, dass im Komplex von TF mit Faktor VIIa weniger Bindungsstellen für Faktor Xa freiliegen, was die geringere Effektivität der Gerinnungskaskade erklären würde (Bach et Moldow 1997, Rao et al. 2012).

Einen weiteren Erklärungsversuch lieferten Dietzen et al. 2004 mit der Theorie, dass der Aktivitätszustand mit der Assoziation mit gewissen Lipidinseln zusammenhängt. Auf embryonalen Nierenzellen (HEK 293) wurde in dieser Studie gezeigt, dass TF auf der Zelloberfläche in lockerer Verbindung mit jenen Lipidinseln steht. Eine Zerstörung der Lipidinseln mit Methyl- β -Cyclodextrin führte zu einem schnellen Anstieg der TF-PCA, ohne dass zugleich die absolute TF-Antigenität zunahm oder PS externalisiert wurde. Nach einer Studie von Mandal et al. von 2005 soll es sich bei diesen Lipidinseln um besonders Cholesterol-reiche Domänen handeln.

Im Jahr 2006 wurde von Ahamed et al. ein neues Konzept vorgestellt, das bis heute zu

Kontroversen Anlass gibt. Demnach soll für die Modulation des Aktivitätszustands vom TF der Redoxstatus der membrannahen Cysteine (Cys¹⁸⁶ und Cys²⁰⁹) verantwortlich sein. Dass eine Disulfidbrücke zwischen diesen beiden Cysteinen für eine effektive Gerinnung erforderlich ist, wurde schon in einer Arbeit von Rehemtulla et al. 1991 gemutmaßt. Der Arbeit von Ahamed et al. zufolge liegen diese Cysteine bei kryptischem TF reduziert mit freien Thiolgruppen, S-nitrosyliert oder als gemischtes Disulfid mit Glutathion vor. Bilden sie hingegen unter Oxidation eine Disulfidbrücke aus, wandelt sich TF in seine aktive, prokoagulatorische Form um. Die Autoren beziehen sich mit dieser These auf die Beobachtung, dass TF, der durch Mutation an Stelle der Cysteine Serin oder Alanin an dieser Position trägt, signifikant an prokoagulatorischer Aktivität verliert. Darüber hinaus berichten die Autoren, dass es ihnen gelang, die TF-Aktivität deutlich zu steigern, indem die Zellen mit HgCl₂ behandelt wurden, welches Dithiolgruppen zu Disulfiden oxidiert. Zu demselben Ergebnis kamen 1994 schon Kaneko et al. bei Experimenten mit Myeloblasten der Linie U937. Weiter gestützt wird das Konzept durch Experimente mit Thiolblockern wie N-Ethylmaleimid (NEM), die zu einer Abnahme der TF-PCA führten.

Während die Aktivität des TF hinsichtlich der Gerinnung von dieser Disulfidbrücke abzuhängen scheint, kann es seine charakteristische Signalwirkung über PAR-2 auch nach Mutation an Cys¹⁸⁶ beibehalten (Ahamed et al. 2006).

In verschiedenen Arbeiten wird dem Enzym Proteindisulfidisomerase (PDI) die Fähigkeit zugeschrieben, bei der Regulation des Redoxzustandes der beiden Cysteine entscheidend mitzuwirken und damit Einfluss auf die Aktivität des TF auszuüben (Ahamed et al. 2006, Chen et al. 2006). Diese Theorie ist auf teilweise heftige Kritik gestoßen (Pendurthi et al. 2007), konnte aber schon von mehreren Studien mit In-vivo-Modellen gestützt werden, die nach einer Hemmung der PDI durch Bacitracin oder PDI-Antikörper bei Mäusen eine erhöhte Blutungsneigung und eine verringerte Fibringeneration beobachteten (Reinhardt et al. 2008, Cho et al. 2008). Die Infusion von rekombinanter PDI führte in diesen Studien wiederum zu einer vermehrten Fibringeneration. Als weiteres Zeichen der prokoagulatorischen Wirkung der PDI wurden hier erhöhte PDI-Konzentrationen in der unmittelbaren Umgebung von Thrombozytenaggregaten nach Gefäßverletzung gemessen. Reinhardt et al. kamen in ihrer Studie von 2008 zu dem Ergebnis, dass ein Teil des TF konstitutiv glutathionyliert ist. Die PDI katalysiert dabei eine Isomerisierungsreaktion, bei der TF an Stelle des gemischten Disulfids eine intramolekulare Disulfidbrücke ausbildet, was eine Steigerung der TF-PCA zur Folge hat.

1.4. Das Enzym Proteindisulfidisomerase

1.4.1. Vorkommen, Struktur und Funktion

Das Enzym PDI kommt hauptsächlich im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) vor. Dort ist es an der posttranslationalen Modifikation von Proteinen beteiligt. Die PDI ist somit für den Erhalt des Zellstoffwechsels und das Überleben einer Zelle essentiell. Es ist daher nicht verwunderlich, dass es unter Stressbedingungen für die Zelle zu einer Hochregulation der Expression dieses Enzyms kommt (Turano et al. 2002).

Sie ist Mitglied einer Enzymfamilie von rund 20 bekannten Thiolisomerasen, die am ER als Oxidoreduktasen aktiv sind. Auch die PDI kann ihrerseits in viele Unterformen unterteilt werden, von denen in den letzten Jahren immer mehr identifiziert wurden. Als Beispiel sei das 2003 von Alanen et al. gefundene ERp18 aufgeführt.

Eine Besonderheit der PDI ist es, dass sie in der Zelle mehrere Funktionen innehat, die voneinander gänzlich unabhängig sind (Wang et Tsou 1993). Sie katalysiert gleichermaßen Oxidationen, Reduktionen und Isomerisierungen von Proteinen über Ausbildung und Spaltung von Disulfidbrücken. Neben dieser Funktion als Oxidoreduktase erfüllt sie eine Aufgabe als Chaperon-Protein. Chaperon-Proteine unterstützen die Faltung und Organisation von Proteinen, um deren Funktionsfähigkeit sicherzustellen. Dabei können sie kovalente Bindungen weder einfügen noch spalten. Sie selbst sind auch niemals Teil der finalen Struktur (Georgopoulos 1992). Anders als Enzyme agieren Chaperone völlig Substrat-unspezifisch. Für Chaperone kennzeichnend ist auch eine sehr niedrige Substratumsatzrate. Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass die PDI als Denitrosylase und Transnitrosylase die Aufnahme von NO in die Zelle vermittelt und die Thrombozytenaktivierung über Integrine reguliert. Auch eine proteolytische Aktivität und die Fähigkeit, Kalzium, ATP oder andere kleine Liganden zu binden, werden der PDI zugeschrieben. Es soll maßgeblich vom Redoxzustand der jeweiligen Umgebung abhängen, welche ihrer vielfältigen Funktionen die PDI jeweils ausübt (Fränd et Kaiser 1999).

Diese beiden Funktionen konnten umschriebenen Domänen innerhalb des Enzyms zugeordnet werden. Der Aufbau der PDI wird in insgesamt vier Domänen unterteilt, die beiden in ihrer Struktur homologen, mittig gelegenen Domänen b und b', und die beiden sich peripher anschließenden, ebenfalls strukturhomologen Domänen a und a'. Im Jahr 2004 wurde von Pirneskoski et al. noch ein verbindender, sogenannter x-Linker zwischen der b'- und der

a'-Domäne identifiziert, was diesen beiden eine größere Flexibilität und Unabhängigkeit voneinander ermöglicht.

Die eher hydrophoben Domänen b und b' werden als nonkatalytisch eingeschätzt und können der Chaperon-Funktion zugeschrieben werden. Sie sind außerdem für die Bindung der zu katalysierenden Substrate zuständig. Die Cystein-reichen a-Domänen stellen den als Oxidoreduktase katalytisch aktiven Teil des Enzyms dar. Der Redoxzustand dieser Cysteine ist für die Funktionsweise der PDI entscheidend. Liegen sie reduziert vor, fungiert die PDI als Reduktase, sind sie dagegen oxidiert, fungiert sie als Oxidase (Ellgaard et Ruddock 2005). In ihrer funktionell aktiven Form bildet sie ein Homodimer (Wallis et al. 2009). In beiden Wirkungsweisen, als Oxidoreduktase wie als Chaperon, könnte die PDI für die Funktionen des TF relevant sein.

Obwohl die PDI über ein C-terminales Retentionspeptid verfügt, das sie am ER verankert (Munro et Pelham 1987), konnte sie auch in anderen Zellkompartimenten nachgewiesen werden. Auf gewissen Zelltypen, zum Beispiel Lymphozyten (Täger et al. 1997), Thrombozyten (Essex et al. 1995) und Endothelzellen (Wan et al. 2012), wurde die PDI bereits auf der Oberfläche nachgewiesen. Auf Endothelzellen wird die Expression von PDI durch eine Gefäßverletzung induziert (Jasuja et al. 2010).

Die PDI soll in den Ablauf vieler verschiedenartiger Prozesse innerhalb des Zellstoffwechsels involviert sein. So konnte unter anderem eine Rolle der PDI auch beim Zellbefall durch Viren, insbesondere HIV (Ryser et al. 1994), bei der Ausbreitung von Gliomzellen (Goplen et al. 2006) und bei der Überlebensfähigkeit von Melanomzellen (Lovat et al. 2008) aufgezeigt werden. Eine Beteiligung der PDI bei der Ausbildung von Blutgerinnseln ist durch In-vivo- ebenso wie In-vitro-Studien untermauert worden (Reinhardt et al. 2008, Cho et al. 2008). All dies macht die PDI zu einem vielversprechenden Angriffspunkt therapeutischer Maßnahmen.

Es gibt mehrere Aspekte der Blutgerinnung, in die die PDI verwickelt sein soll. Mehrfach schon gelang es, in Mausmodellen zu zeigen dass die PDI für eine effektive Aggregation von Thrombozyten erforderlich ist (Manickam et al. 2008; Raturi et al. 2008; Cho et al. 2008). Im Rahmen der Thrombusformation soll die PDI von Thrombozyten dann auch in den Extrazellulärraum freigesetzt werden. Von Cho et al. (2008) wurde eine rasche PDI-Sekretion bei der Thrombusbildung in vivo gemessen.

Reinhardt et al. konnten 2008 in vivo ebenso wie in vitro zeigen, dass die PDI für eine effektive Aktivierung des TF erforderlich ist. Sie untersuchten die prokoagulatorische Aktivität (PCA) des TF mit und ohne einen PDI-Antikörper und maßen in Gegenwart des

PDI-Antikörpers eine verringerte TF-PCA. Im murinen Modell konnten die Autoren eine hohe PDI-Dichte an Orten mit thrombotischen Läsionen messen, was zusätzlich auf eine Beteiligung der PDI bei der Thrombusentstehung hindeutet.

Zhou et al. entdeckten 2009 bei einem Modell für venöse Thrombosen und Embolien an Ratten eine auffallende Kolo-kalisation von PDI und TF und damit einen weiteren Hinweis darauf, dass die PDI für die TF-abhängige Gerinnung von Bedeutung ist.

1.4.2. Inhibitoren der PDI

1.4.2.1 Rutin

Die selektive Ausschaltung der PDI mit einer kleinmolekularen Substanz gelang Jasuja et al. 2012 erstmals mit dem Flavonoid Rutin.

Rutin, welches zuweilen auch als Rutinosid, Quercetin-3-O-Rutinosid oder Sophorin bezeichnet wird, besteht aus dem Flavonol Quercetin, das am C₃-Atom O-glykosidisch mit dem Disaccharid Rutinose verknüpft ist. Rutin ist als Bestandteil einiger Nahrungsmittel, etwa Buchweizen oder Tee, bekannt. Darüber hinaus wurde Rutin in den Blüten und Blättern einiger Pflanzen gefunden, wo es als Antioxidans fungiert. In Wasser, Ethanol und Methanol ist Rutin gut löslich.

Im menschlichen Körper soll Rutin antioxidativ, antiallergisch, antibakteriell, antifungal, antiviral und antikarzinogen wirken, was es zu einer Substanz von pharmakologischem Interesse macht. Diese angebliche Wirkung kommt vor allem durch die Unterdrückung der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies und durch direkte Interaktionen mit Enzymen und der DNA zustande (Páyan-Gómez et al. 2010).

Strukturanaloga des Rutins zeigten, wenn auch mit geringerer Potenz, in der Arbeit von Jasuja et al. ebenfalls eine inhibitorische Wirkung auf die PDI. Eine unbedingte Voraussetzung für die Entfaltung dieser inhibitorischen Wirkung scheint das Bestehen einer O-glykosidischen Bindung am C₃-Atom zu sein, ohne die keine PDI-Hemmung mehr zu beobachten war.

Jasuja et al. beschreiben Rutin als einen hochspezifischen Inhibitor der PDI, da eine Hemmung anderer Enzyme aus der Kategorie der Thiolisomerasen nicht gelang. Eine kovalente Bindung von Rutin an die PDI wird nicht angenommen, da sich die Hemmung der

PDI als reversibel erwies. In jener Arbeit wurde als IC_{50} des Rutins ein Wert von $6,1 \mu\text{M}$ ermittelt.

Jasuja et al. zufolge wirkt Rutin nur auf die extrazelluläre PDI, da es wegen seiner O-glykosidischen Bindung nicht membranpermeabel sei. Sie vermuten aus diesem Grund keine zytotoxische Wirkung, wie sie nach Ausschaltung der PDI auf genetischer Ebene beschrieben ist (Hashida et al. 2011). Rutin selbst unterliegt einem vielfältigen Metabolismus, aus dem bis zu 60 Derivate hervorgehen (Olthof et al. 2003), die teilweise, wie beispielsweise Quercetin-3-O-Glucuronid, ebenfalls die PDI hemmen können.

1.4.2.2. Bacitracin

Während die Identifikation des Rutin als PDI-Hemmstoff eine neue Errungenschaft darstellt, ist das Antibiotikum Bacitracin schon seit 1981 für seine hemmende Wirkung auf die PDI bekannt (Roth 1981). Bacitracin wirkt als Antibiotikum, indem es die Zellwandbiosynthese von Bakterien als Komplex mit divalenten Kationen unterbindet (Stone et Strominger 1971). Bacitracin hemmt die PDI allerdings nicht spezifisch, sondern wirkt unspezifisch auch auf die anderen Enzyme der Thiolisomerasen-Familie, der die PDI angehört, wie Karala et Ruddock 2010 mit In-vitro-Experimenten belegten. Bacitracin ist als PDI-Inhibitor schon breit in der Forschung eingesetzt worden.

Bacitracin wird von bestimmten Unterformen des *Bacillus licheniformis* und *Bacillus subtilis* synthetisiert. Es besteht in seiner Grundstruktur aus einem Peptidring aus 7 Aminosäuren mit einer Seitenkette aus weiteren 5 Aminosäuren, an deren Ende sich ein Thiazolin-Ring befindet. In kommerziell erhältlichem Bacitracin, wie hier verwendet, befinden sich zahlreiche Varianten dieses Dodekapeptids, als Bacitracin A bis H bezeichnet, die sich in dem Redoxstatus des Thiazolin-Rings oder durch Substitution einzelner Aminosäuren unterscheiden. Die einzelnen Varianten weichen hinsichtlich ihrer IC_{50} gegenüber der PDI stark voneinander ab.

Es besteht die Theorie, dass freie Thiolgruppen des Bacitracins mit Cysteinen der PDI unter Ausbildung von Schwefelbrücken eine stabile Bindung eingehen, und so deren Aktivität gehemmt wird (Dickerhof et al. 2011).

1.5. Fragestellung

Thromboembolische Ereignisse und systemische Gerinnungsstörungen wie eine DIC mit Hyperfibrinolyse stellen eine häufige und oft folgenschwere Komplikation der AML dar. Es ist unstrittig, dass dieses erhöhte Risiko zum Teil auf die Überexpression von TF auf AML-Zellen zurückzuführen ist. TF liegt bei Ausbleiben von stimulierenden Faktoren jedoch größtenteils in einer kryptischen, nicht gerinnungsaktiven Form vor und muss zunächst aktiviert werden, um als Komplex mit Faktor VIIa die extrinsische Gerinnung initiieren zu können. Mittlerweile gibt es eine Reihe von Hypothesen zu dem dieser Aktivierung zugrundeliegenden Mechanismus. In dieser Arbeit sollte das Modell von der PDI als regulierender Faktor der TF-Aktivität näher untersucht werden.

Zunächst sollte anhand eines Insulin-Reduktions-Assays die 2012 durch Jasuja et al. erfolgte Charakterisierung von Rutin als Inhibitor aufgereinigter, rekombinanter PDI verifiziert werden. Die Wirkung des Rutin sollte nicht nur an rekombinanter, sondern auch an Zelloberflächen-assoziiierter PDI getestet werden. In gleicher Weise sollte die Hemmung durch Bacitracin bestätigt werden.

Im nächsten Schritt sollten Veränderungen analysiert werden, die auf Myeloblasten durch Hemmung der PDI eintreten. Hierzu sollten Zellen eingesetzt werden, die ursprünglich aus dem peripheren Blut von AML-Patienten gewonnenen wurden und seither unter standardisierten Bedingungen in Kultur gehalten wurden. Von Interesse sind dabei sowohl kurzfristige Effekte, die nach einer PDI-Hemmung über 30 Minuten eintreten, als auch langfristige Effekte, die sich nach einer Inkubation über 24 h einstellen. Eine Zu- oder Abnahme der TF-PCA sollte dokumentiert und quantifiziert werden. Es sollte dabei mit beachtet werden, ob eine Verbindung zwischen der PCA-Entwicklung und einer PS-Exposition besteht. Gleichzeitig sollten quantitative Veränderungen der TF-Expression bestimmt werden.

Neben den Auswirkungen einer PDI-Hemmung allein sollte anschließend untersucht werden, ob sich die durch Daunorubicin induzierte TF-Aktivierung durch eine Hemmung der PDI modifizieren lässt. Jede Veränderung der TF-Aktivität sollte auf einen möglichen Zusammenhang mit einer PS-Externalisierung überprüft werden.

Zuletzt sollten die gleichen Experimente an Leukämiezellen durchgeführt werden, die ohne vorausgegangene Kultivierung direkt von AML-Patienten isoliert wurden.

2. Materialien und Methoden

2.1. Zellkultur

Die Versuche wurden an myelomonozytären Zelllinien durchgeführt, die von der DMSZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) des Leibniz Instituts, Braunschweig, erworben wurden. Es wurden zwei Zelllinien verwendet, die ursprünglich von Patienten isoliert wurden:

- HL60: Diese Zellen entstammen dem Blut einer 35jährigen Patientin mit Akuter Myeloischer Leukämie (AML), die dem Subtyp M2 in der French American British (FAB) Classification zuzuordnen ist. Diese Zellen befinden sich in einem kontinuierlichen Differenzierungsprozess. Dabei entwickeln sie sich teilweise zu neutrophilen Promyelozyten, teilweise zeigen sie eine Gemeinsamkeiten mit Monozyten (Gallagher et al. 1979).
- THP1: Diese Zelllinie wurde von einem einjährigen AML-Patienten gewonnen. Es handelt sich um Zellen vom Typ FAB M5 oder der Akuten Monozytären Leukämie (Tsuchiya et al. 1980).

Beide Zelllinien wurden in einem Nährmedium aus RPMI 1640 mit 10% fetalem Kälberserum (beides Gibco, Life Technology GmbH, Darmstadt) mit 5% atmosphärischem CO₂ bei 37°C kultiviert, was der physiologischen Körpertemperatur entspricht. Wegen der für myeloblastische Zellen typischen hohen Proliferationsrate war es erforderlich, die Zellkulturen etwa dreimal wöchentlich zu "splitten", was bedeutet, der Zellsuspension einen Teil ihres Volumens zu entnehmen und durch frisches Nährmedium zu ersetzen. So wurde verhindert, dass die Zellkulturen durch zu hohe Zelldichte oder Übersäuerung des Mediums in ihrer Proliferation und Vitalität beeinträchtigt wurden.

Zur Messung der TF-Aktivität wurden die Zellkulturen jeweils am Vortag gesplittet.

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank durchgeführt, um eine Kontamination mit Bakterien oder Pilzen zu vermeiden.

2.2. Untersuchung des Einflusses von Inhibitoren der PDI auf die prokoagulatorische Aktivität des TF auf Myeloblasten

Die prokoagulatorische Aktivität wurde in einem einstufigen Gerinnungstest über einen modifizierten Ansatz zur Messung der Prothrombinzeit in einem Kugelkoagulometer (KC 10, Heinrich Amelung GmbH, Lemgo) erfasst.

2.2.1. Vorbereitung

2.2.1.1. Mediumaustausch

Zu Beginn eines jeden Versuchs wurde die Zellsuspension immer mit 1400 rpm (*rounds per minute*, deutsch: Umdrehungen pro min) bei Raumtemperatur 5 min lang zentrifugiert. Der so entstandene Überstand wurde vorsichtig abgehoben, und das verbliebene Zellpellet wurde in frischem Nährmedium resuspendiert.

2.2.1.2. Einstellen der Zellzahl

Unter dem Lichtmikroskop wurde die Zelldichte in dieser Suspension bestimmt. Hierzu wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau angefärbt und auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Da 10 Zellen auf 16 Feldern einer Konzentration von $1,0 \times 10^6$ Zellen pro ml entsprechen, konnte so die Zelldichte in der Suspension bestimmt werden.

Durch Anpassung ihres Volumens wurde die Zellsuspension auf eine standardisierte Endkonzentration von $1,0 \times 10^6$ Zellen pro ml eingestellt.

2.2.2. Inkubation

Die Zellsuspension wurde unter sterilen Bedingungen gemeinsam mit dem PDI-Inhibitor auf eine 6-Well-Platte (Becton Dickinson, Heidelberg) gegeben und bei 37°C über

24 h inkubiert. Zur Ermittlung der Konzentrationsabhängigkeit wurde die Dosis des Inhibitors variiert. Zur Kontrolle wurde jeweils bei ansonsten identischen Bedingungen eine Probe mit der jeweiligen Trägersubstanz, meist der Phosphatpuffer PBS (*phosphate buffered saline*, von Gibco, Life Technology GmbH, Darmstadt) anstelle des Inhibitors angesetzt. Die Proben wurden durch vorsichtiges Hin- und Herschwenken der Platte gemischt.

Als Inhibitoren kamen die folgenden Substanzen zum Einsatz:

- Bacitracin (Sigma Aldrich, Seelze), als gelbliches Pulver geliefert, in destilliertem Wasser gelöst
- Rutin (Sigma Aldrich, Seelze), in Wasser und Ethanol im Verhältnis 1:2 gelöst

Durch Verdünnen mit PBS wurden die Substanzen jeweils auf die erforderliche Konzentration eingestellt.

Zur Feststellung der Zeitabhängigkeit der Effekte wurden die Proben in 6 h-Intervallen aus der Inkubation entnommen und in den weiteren Reaktionsablauf überführt.

Sollte der Effekt einer PDI-Hemmung an apoptotischen Zellen untersucht werden, wurde das Chemotherapeutikum Daunorubicin (DNR 1 μ M, Sigma Aldrich, Seelze) zugegeben. Auch in diesen Fällen wurde jeweils eine Kontrollprobe mit angesetzt, die abgesehen von der Zugabe des DNR identisch vorbehandelt wurde.

2.2.3. Messung der Gerinnungszeit am Kugelkoagulometer

Nach Ende der Inkubation wurden die Zellen zentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig abgehoben, und das verbliebene Zellpellet wurde in PBS resuspendiert. Um eine übereinstimmende Zellkonzentration zwischen den einzelnen Proben sicherzustellen, wurde die Zellzahl jeder Probe zunächst mit Hilfe eines Gerätes für automatische Zellzahlbestimmung (ViCell XR, Beckmann Coulter, Krefeld) bestimmt. Proben, die mit DNR behandelt worden waren, wiesen im Vergleich zu unbehandelten Proben eine geringere Zellzahl auf. Die Resuspension erfolgte mit einer Zielkonzentration von $1,0 \times 10^6$ /ml.

Nach der Resuspension in PBS wurden die Zellen zunächst 10 min stehen gelassen. Anschließend wurde die TF-spezifische prokoagulatorische Aktivität der Zellen an einem Kugelkoagulometer bestimmt. Hierzu wurden 100 μ l der Zellsuspension gemeinsam mit

100 µl Standardhumanplasma (SHP, Hemosil®, Instrumentation Laboratory, Mailand, Italien) 2 min lang bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 50 µl 0,025 M CaCl₂-Lösung zur Initiierung der Gerinnungskaskade wurde die Zeit bis zur Gerinnselbildung gemessen.

Jede Probe wurde am KC10 in als Doppelansatz gemessen. Die weitere Analyse der TF-Aktivität bezog sich dann auf den Mittelwert eines Doppelansatzes.

2.2.4. Messung der TF-PCA in einer Zellsuspension

Die exakte Menge einzelner, aktiver TF-Moleküle ist schwer bestimmbar. Ersatzweise wurden willkürlich TF-Einheiten festgesetzt, die als Grundlage aller Aussagen dieser Arbeit dienten. Zur Definition dieser TF-Einheiten wurde eine Standardkurve mit Innovin® (Dade Behring, Deerfield, IL, USA/ Siemens, München) in schrittweisen Verdünnungen von 1:10 bis 1:10⁵ benutzt. In Innovin® befindet sich rekombinanter TF. Für die einzelnen Innovin®-Verdünnungen wurde nun analog der eben beschriebenen Methode mit SHP am Kugelkoagulometer die jeweilige Gerinnungszeit ermittelt. Die Innovin®-Verdünnung wurde in einem halblogarithmischen Koordinatensystem gegen die Gerinnungszeit aufgetragen. Es wurde festgesetzt, dass eine 1:10 Verdünnung des Innovin® der prokoagulatorischen Aktivität (PCA) von 100.000 Einheiten TF entsprach.

Mit Hilfe der so kalibrierten Kurve war es möglich, aus der Gerinnungszeit einer Probe im KC10 auf die TF-Aktivität rückzuschließen.

Zur Vergewisserung, dass in diesem Versuchsansatz tatsächlich die TF-PCA gemessen wird, wurden in vorausgegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe die Zellen der Linien HL60 (Langer et al. 2004) und THP1 (Langer et al. 2013) mit einem monoklonalen TF-Antikörper inkubiert. Wurden die Zellen daraufhin im KC10 nach der beschriebenen Methode analysiert, war nahezu keine PCA mehr messbar (Daten hier nicht gezeigt).

2.3. Untersuchung des Einflusses von Inhibitoren der PDI auf die TF-abhängige PCA auf Mikropartikeln

Die untersuchten Mikropartikel wurden aus den zellfreien Überständen isoliert, die am Ende der Inkubationszeit mit einem PDI-Inhibitor nach dem Zentrifugieren abgehoben und bei -80°C konserviert wurden.

Die prokoagulatorische Aktivität von TF auf diesen Mikropartikeln wurde mittels eines Technothrombin TGA (*Thrombin Generation Assay*) Kits von Technoclone (Wien) untersucht. Dabei wurde die kontinuierliche Thrombingenerierung im Zeitverlauf erfasst. Den Nachweis für das Auftreten von Thrombin lieferte ein fluorogenes Substrat, das durch die Protease Thrombin gespalten wird.

Um die Mikropartikel aus aufgetautem Überstand zu isolieren, wurde 1 ml Überstand in einer Mikrozentrifuge (Eppendorf Laborgeräte, Hamburg) 1 h lang bei 16.000 rpm zentrifugiert, sodass sich die Mikropartikel als Pellet absetzten. Dieses Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und erneut 1 h lang bei 16.000 rpm zentrifugiert. Das diesmal entstandene Pellet wurde nur in 100 µl PBS resuspendiert.

Zu dieser Suspension wurden 100 µl Standardhumanplasma (SHP) gegeben, welches zuvor durch analoge Zentrifugation von intrinsischen Phospholipiden befreit wurde. 40 µl von der so entstandenen Suspension wurden zu 60 µl des fluorogenen Substrats gegeben. Die Messung erfolgte in einem *Microplate Reader* (FLx800 von Biotek, Winooski, VT, USA) mit einer Filtereinstellung von 360 nm Exzitation/460 nm Emission.

Als Maß für die prokoagulatorische Aktivität dienen:

1. die Lag-Phase als Latenzzeit bis zum Beginn der Thrombinbildung
2. der Thrombin-Peak als die maximale Menge des zu einem Zeitpunkt gebildeten Thrombins
3. die AUC (*area under the curve*) als Gesamtmenge des im Zeitverlauf gebildeten Thrombins

2.4. Bestimmung des Anteils an apoptotischen Zellen in einer Suspension

Im Rahmen einer Apoptose kommt es schon in einem frühen Stadium zur Verlagerung des Phospholipids Phosphatidylserin (PS) auf die Außenseite der Zellmembran. Daher können Zellen als apoptotisch gewertet werden, die PS auf ihrer Oberfläche aufweisen.

Der Nachweis von PS auf der Zelloberfläche erfolgte durch fluoreszenzmarkiertes Annexin V (BD, San Jose, CA, USA), welches in Gegenwart eines Ca^{2+} haltigen Bindungspuffers an PS bindet. Der Anteil der Zellen, die mit Annexin V eine Bindung eingingen, konnte an einem Durchflusszytometer (FACSCalibur, BD, San Jose, CA, USA) prozentual ermittelt werden.

Einen quantitativ weniger genauen Hinweis auf einen hohen Anteil apoptotischer Zellen in einer Suspension lieferte ein rot gefärbter Überstand, welcher im Kontrast zu dem gelben Überstand von Suspensionen mit einer vitalen Zellpopulation mit höherem Nährstoffverbrauch stand. Zellen, die schon das Stadium der sekundären Nekrose und damit das Endstadium der Apoptose erreicht hatten, waren bei Betrachtung unter einem Lichtmikroskop pyknotisch und deformiert.

2.5. Semiquantitative Bestimmung von TF und PDI auf der Zelloberfläche

Zur quantitativen Bestimmung von TF und PDI auf der Zelloberfläche wurden monoklonale und polyklonale Antikörper gegen TF bzw. PDI eingesetzt.

Der Antikörper zur Detektion des TF (Klon HTF-1, BD, San Jose, CA, USA) war an den Fluoreszenzfarbstoff PE (Phycoerythrin) gekoppelt; somit konnte der Anteil der Zellen, an den der Antikörper gebunden hatte, durch Detektion der Fluoreszenzemission am Durchflusszytometer quantitativ bestimmt werden. Die Konzentration des Antikörpers lag bei 20 µg/ml.

Als Referenzprobe diente dabei eine identisch vorbehandelte Probe mit einem unspezifischen Antikörper desselben Subtyps (IgG).

Zum Nachweis der PDI auf der Zelloberfläche wurde der monoklonale Mausantikörper RL90 (100 µg/ml; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) oder alternativ ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper (50 µg/ml; abcam®, Cambridge, MA, USA) eingesetzt. Nach 15minütiger Inkubation wurden nicht gebundene Antikörper aus den Proben durch Zentrifugieren, Abheben des Überstands und Resuspension in PBS entfernt. Daraufhin wurde ein sekundärer Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)-markierter Antikörper, der seinerseits gegen antikörperspezifische Bestandteile gerichtet ist, zugegeben und für 15 min mit der Probe inkubiert. Im Anschluss wurden auch hier die ungebundenen Antikörper durch zweimaliges Waschen entfernt.

Im Durchflusszytometer erfolgte daraufhin die Analyse des Bindungsmusters des sekundären Antikörpers, welches Rückschlüsse auf die PDI-Expression auf der Zelloberfläche ermöglichte.

2.6. Quantitative Bestimmung des gesamten zellulären TF

Um den intrazellulären ebenso wie den oberflächlichen TF durch Antikörper nachweisen zu können, wurden $1,0 \times 10^6$ HL60-Zellen/ml mit 300 μ l 1% Triton X-100 vorbehandelt und über 4 h auf Eis gelagert. Triton X-100 ist ein biochemisches Detergenz, das dazu genutzt werden kann, Membranproteine wie TF aus der Phospholipidschicht herauszulösen.

Die Vorbehandlung mit Triton X-100 wurde an HL60-Zellsuspensionen vorgenommen, die mit 100 μ M Rutin, 5 mM Bacitracin oder nur mit PBS als Kontrollprobe über 24 h inkubiert worden waren. Dabei wurde jede Probe in dreifacher Ausführung behandelt. Durch diese Vorbehandlung wurde erreicht, dass aus dem Zellpellet ein homogenes Lysat entstand. In diesem Lysat erfolgte dann mit einem kommerziellen ELISA-Kit (Quantikine® ELISA von R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) die quantitative Bestimmung des gesamten zellulären TF.

Je 100 μ l dieses Lysats wurden auf eine Mikroplatte gegeben, die mit monoklonalen TF-Antikörpern beschichtet war. Nach einer Inkubation über 2 h auf einem sogenannten *Microplate Shaker* wurden nicht kovalent gebundenen Bestandteile des Lysats durch viermaliges Waschen entfernt. Anschließend wurden 200 μ l eines polyklonalen TF-Antikörpers zugegeben, an den eine Peroxidase gekoppelt war, und nach einer 30-minütigen Inkubation wurden die ungebundenen Antikörper durch erneutes viermaliges Waschen entfernt. Nun wurden 50 μ l einer H_2O_2 -haltigen Lösung dazugegeben. Durch eine Reaktion des H_2O_2 mit der Peroxidase entstand ein Farbstoff, der sich über die Messung der optischen Dichte (OD) in einem *Microplate Reader* bei einer Wellenlänge von 540 nm nachweisen ließ.

Durch Integration der ermittelten OD in eine Standardkurve, die auf der Basis einer rekombinanten TF-Kontrolllösung kalibriert wurde, ließ sich auf den TF-Gehalt in dem jeweiligen Lysat schlussfolgern.

2.7. Charakterisierung von Rutin und Bacitracin als Inhibitoren der PDI

Die Materialien zu diesem Versuch entstammten dem *ProteoStat™ PDI Activity Assay Kit* von Enzo Life Sciences, Lörrach.

Dieser kommerzielle Assay basiert auf einer Redoxreaktion zwischen Insulin und Dithiothreitol (DTT). Als Oxidoreduktase kann die PDI diese Reaktion katalysieren. Dabei

entstehende Insulinaggregate binden an einen Farbstoff, der rote Fluoreszenz emittiert.

In einer schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatte wurde zunächst eine Referenzprobe angesetzt, die nur die beiden Reagentien Insulin (160 μ M) und DTT (0,1%) mit Puffer enthielt. In einer weiteren Probe wurden zu dieser Mischung 10 μ l rekombinante PDI gegeben, was einer Enzymmenge von 2-4 Units entspricht.

In weiteren Ansätzen wurde zu den genannten Reagentien und rekombinanter PDI noch die zu testende Substanz, Rutin oder Bacitracin, in variabler Konzentration gegeben.

Die Menge an Puffer wurde in den Proben so adjustiert, dass am Ende in allen Ansätzen das gleiche Volumen enthalten war. Jede Probe war in doppelter Ausfertigung auf der Platte vorhanden.

Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur an einem lichtgeschützten Ort wurde mit einem Stopreagenz, das 30% H₂O₂ und Dimethylsulfoxid enthielt, die Reaktion beendet. Nun wurde der rote Fluoreszenzfarbstoff zugegeben, der in den folgenden 15 min an das durch Reduktion denaturierte Insulin binden konnte. Auch diese Inkubation fand an einem lichtgeschützten Ort bei Raumtemperatur statt.

An einem *Fluorescence Microplate Reader* (infinite M200 von Tecan, Männedorf, Schweiz) mit einer Filtereinstellung von Exzitation 500 nm/Emission 600 nm wurde die Fluoreszenz einer jeden Probe gemessen. Die detektierten Fluoreszenz-Einheiten ließen sich als Surrogatparameter für das Ausmaß der PDI-Aktivität verwenden.

2.8. Nachweis von PDI-Aktivität auf der Zelloberfläche

Um die enzymatische Aktivität der PDI auf der Zelloberfläche nachzuweisen, wurde dasselbe *ProteoStat™ PDI Activity Assay Kit* von Enzo Life Sciences, Lörrach, verwendet.

Anstelle der rekombinanten PDI wurden hier Zellen in einer Konzentration von $1,0 \times 10^6$ Zellen/ml zu den übrigen Reagentien gegeben, die in analogen Mengenverhältnissen zu 2.7. vorlagen. Durch gründliches Mischen wurde die Homogenität der Lösung sichergestellt. Die Inkubation und Messung der Fluoreszenz erfolgten ebenfalls analog zu 2.7.

Die so erzeugte Fluoreszenz gab Aufschluss über die auf der Zelloberfläche befindliche PDI-Aktivität.

3. Ergebnisse

3.1. Hemmung der Aktivität rekombinanter PDI durch kleinmolekulare Substanzen

3.1.1. Hemmung rekombinanter PDI durch Rutin

Die von Jasuja et al. (2012) beschriebene inhibitorische Wirkung von Rutin auf die PDI-Aktivität sollte mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Assay-Kits bestätigt werden. Dieser Assay ist dafür konzipiert, kleinmolekulare Substanzen auf ihre Fähigkeit zur PDI-Hemmung hin zu untersuchen. In einer Menge von 2-4 Einheiten katalysiert rekombinante PDI (rPDI) dabei eine Redoxreaktion zwischen Insulin und Dithiothreitol (DTT). Es kommt zu einer Denaturierung des reduzierten Insulins, welches dann über einen fluorogenen Farbstoff nachgewiesen werden kann.

Auch ohne Zugabe von rPDI findet die Redoxreaktion zwischen Insulin und DTT spontan statt, wodurch es ebenfalls zur Emission von Fluoreszenz kommt. Die auf diese Weise entstandene Fluoreszenz ist in den Abbildungen als Leerwert dargestellt (2000 ± 500 Fluoreszenzeinheiten (FE)). In Abwesenheit eines Inhibitors wurden durch die Aktivität von 2-4 Einheiten rPDI 9700 ± 2800 FE gemessen (n=3).

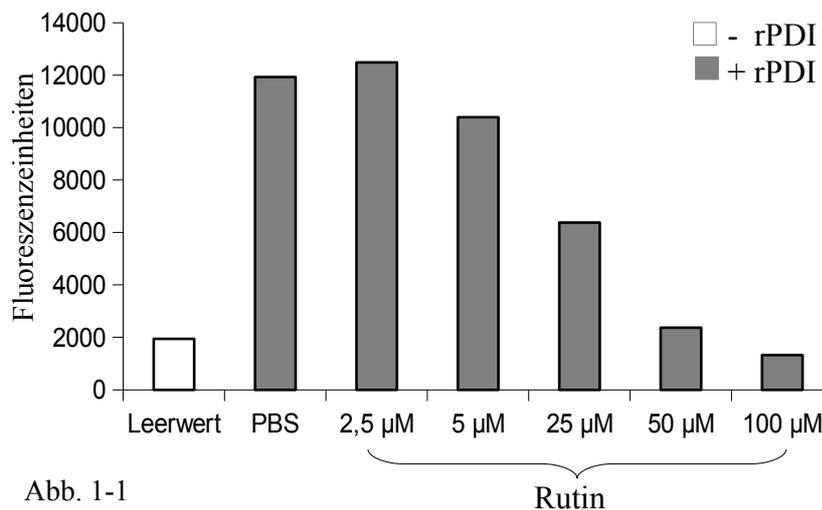


Abb.1-1 zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Experiments. Gibt man rPDI zu den Reagentien Insulin und DTT, kommt es zu einem viel effizienteren Ablauf der Redoxreaktion. Die Zugabe von Rutin statt PBS führt konzentrationsabhängig wieder zu einer Hemmung dieser Reaktion.

Abb. 1-1

Aus Abbildung 1-1 ist ersichtlich, dass sich mit Rutin in dosisabhängiger Weise eine Hemmung der PDI erreichen lässt. Für diesen Effekt wurde in dem Assay eine IC_{50} von $14 \mu\text{M}$ errechnet. Bei einer Rutinkonzentration von $50 \mu\text{M}$ war die PDI-Aktivität zu $>95\%$ gehemmt.

3.1.2. Hemmung rekombinanter PDI durch Bacitracin

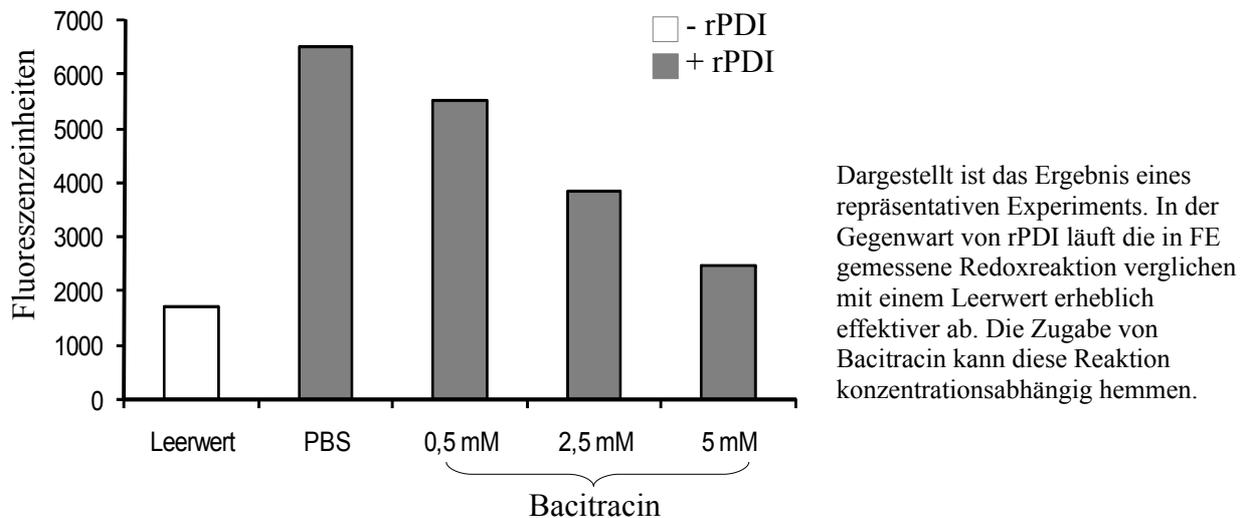


Abb. 1-2

Auch Bacitracin konnte die Aktivität rekombinanter PDI wie in Abb. 1-2 gezeigt in Abhängigkeit von der Dosis hemmen. Als IC_{50} ergab sich eine Konzentration von 0,6 mM. Bei einer Konzentration von 1 mM Bacitracin waren >95% der PDI-Aktivität ausgeschaltet.

3.2. Nachweis von TF auf HL60- und THP1-Zellen

Der positive Nachweis von TF auf der Zelloberfläche war eine Grundvoraussetzung für alle nachfolgenden Experimente. Es wurde zu diesem Zweck der monoklonale, gegen TF gerichtete Antikörper Klon HTF-1 eingesetzt. Dieser Antikörper war an den Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE) gekoppelt. Dadurch war eine durchflusszytometrische Analyse der TF-Expression auf den Zelllinien HL60 und THP1 möglich. Als Kontrolle diente eine Probe mit einem unspezifischen Immunglobulin des gleichen Subtyps (IgG), das ebenfalls an PE gekoppelt war. Die Antikörper wurden in einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ 15 min lang mit der Zellsuspension inkubiert. Durch anschließendes Waschen der Zellen wurden nicht gebundene Antikörper entfernt. In den Abbildungen 2-1 und 2-2 ist zu sehen, wie die Fluoreszenz der Zellen durch Bindung der fluorogenen Antikörper im Durchflusszytometer detektiert wurde.

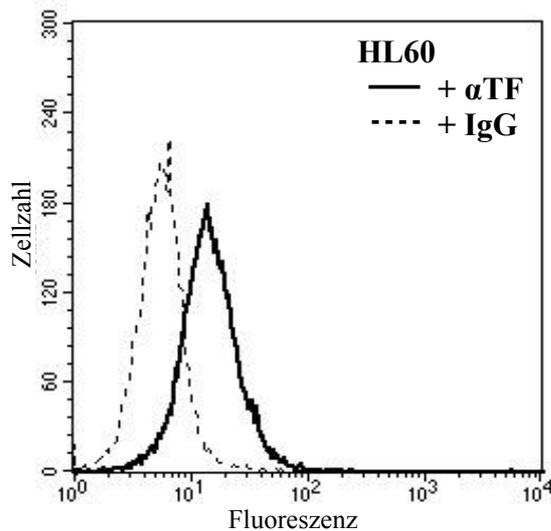


Abb. 2 A

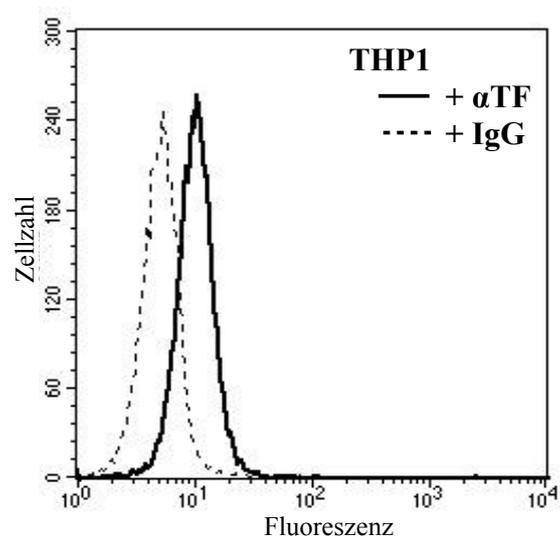


Abb. 2 B

Dargestellt ist je ein repräsentatives Ergebnis mit Zellen der Linie HL60 und THP1. Die Bindungsintensität des α TF ist verglichen mit dem unspezifischen IgG erhöht. Der Effekt ist auf HL60-Zellen stärker ausgeprägt als auf THP1-Zellen.

Wie in den Abbildungen 2 A und B dargestellt, band der TF-Antikörper mit höherer Intensität an die Zelloberflächen als der IgG-Kontrollantikörper. Dies traf auf beide Zelllinien zu, die Bindungsintensität des α TF auf HL60-Zellen (30% α TF versus 1% IgG) übertraf jedoch diejenige auf THP1-Zellen (16% α TF versus 1% IgG). Dieses Ergebnis spricht für eine vergleichsweise hohe TF-Expression auf HL60-Zellen, während die TF-Expression auf THP1-Zellen eher gering ausgeprägt ist.

Auf beiden Zelllinien liegt also auch ohne externe Stimulation eine konstitutive TF-Expression vor.

3.3. Nachweis von PDI auf HL60- und THP1-Zellen

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der PDI und dem Oberflächenprotein TF zu untersuchen, sollte in einem nächsten Schritt geprüft werden, ob die PDI ebenfalls auf der Oberfläche der Zelllinien HL60 und THP1 exprimiert wird. Hierzu kamen PDI-Antikörper zweierlei Art zum Einsatz: der monoklonale Mausantikörper RL90 (100 μ g/ml) und zusätzlich ein polyklonaler Antikörper (50 μ g/ml). Durch den Einsatz unterschiedlich klonierter Antikörper ergaben sich zwei voneinander unabhängige Aussagen über die Expression der PDI auf der Zelloberfläche.

Die Antikörper wurden mit einer Zellsuspension 15 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Als Referenzwerte wurde je eine Probe mit einem unspezifischen Antikörper desselben Subtyps (IgG) und eine Probe mit Puffer anstelle der Antikörper (PBS) angesetzt. Ungebundene Antikörper wurden durch anschließendes Waschen entfernt. Um die Bindung des RL90, des polyklonalen Antikörpers und des unspezifischen IgG zu quantifizieren, wurde ein sekundärer PE-konjugierter Antikörper dazugegeben, der mit den zellgebundenen PDI-Antikörpern reagieren konnte. Nach weiteren 15 Minuten Inkubation wurden die Proben zweimal gewaschen, um auch die ungebundenen Sekundärantikörper zu entfernen.

Das Bindungsverhalten dieses fluoreszenzmarkierten Antikörpers wurde durchflusszytometrisch erfasst und gab Aufschluss über die Expression der PDI auf der Zelloberfläche. In den Abbildungen 3 A-C ist die in den einzelnen Proben detektierte Fluoreszenz farblich kontrastiert dargestellt.

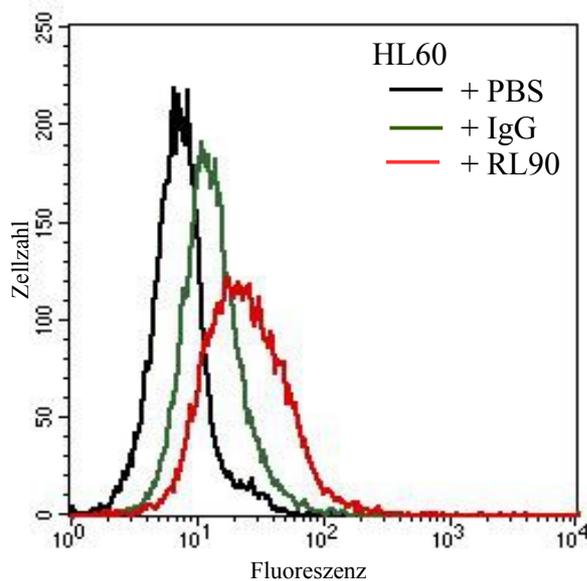


Abb. 3 A

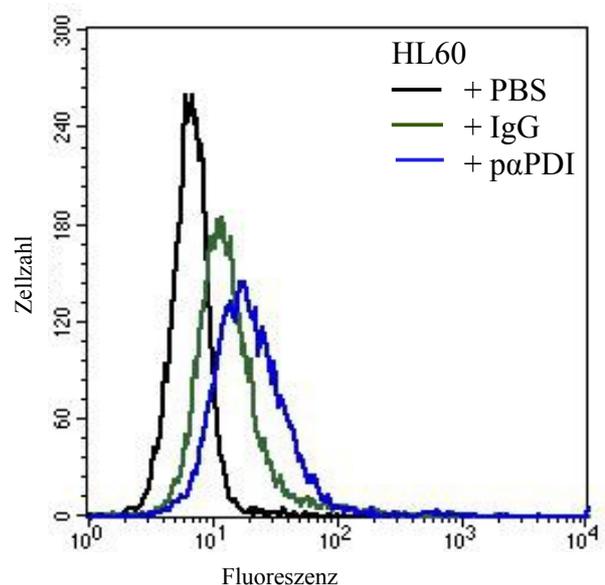


Abb. 3 B

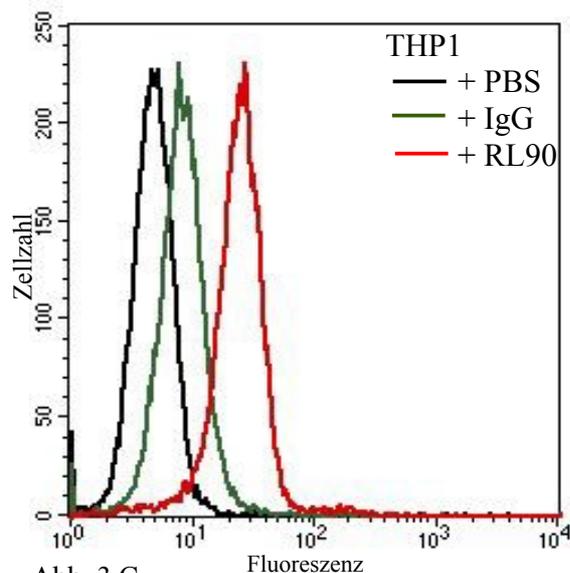


Abb. 3 C

Dargestellt ist das Ergebnis jeweils eines repräsentativen Experiments. Die drei Histogramme zeigen die Fluoreszenzemission der HL60- bzw. THP1-Zellen ohne Zugabe eines Antikörpers (PBS), nach Inkubation mit einem unspezifischen IgG sowie nach Inkubation mit RL90 oder dem polyklonalen paPDI. In allen drei Fällen ist eine erhöhte Bindungsintensität der PDI-Antikörper nachweisbar, die über das unspezifische Binden von IgG hinausgeht.

Wie die Abbildungen 3 A-C zeigen, band der fluorogene Sekundärantikörper mit höherer Intensität an diejenigen Zellen, die mit RL90 beziehungsweise dem polyklonalen PDI-Antikörper (in der Abbildung 3 B als α PDI bezeichnet) vorinkubiert worden waren, im Vergleich zu jenen Zellen, die nur mit dem unspezifischen IgG-Antikörper oder PBS behandelt worden waren. Folglich muss das Epitop dieser Antikörper, die PDI, auf den Zellen vorhanden sein. Es kann also davon ausgegangen werden, dass HL60-Zellen und THP1-Zellen die PDI auf ihrer Oberfläche exprimieren.

3.4. PDI-Aktivität auf der Oberfläche von HL60-Zellen

Nachdem in 3.2. die Expression von PDI auf der Oberfläche von Myeloblasten nachgewiesen werden konnte, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob sie in dieser Lokalisation auch als Thiolisomerase aktiv ist.

Dazu wurde derselbe Test aus dem kommerziell erhältlichen PDI Activity Assay Kit angewandt, der auch schon zur Charakterisierung von Rutin und Bacitracin als Inhibitoren der Aktivität rekombinanter PDI verwendet worden war. Anstelle der rekombinanten PDI wurden in diesem Ansatz die Zellen der Linie HL60 in einer Konzentration von $1,0 \times 10^6$ Zellen/ml im Endansatz eingesetzt. Zwar ist dieses Kit explizit nur zum Testen von Substanzen an aufgereinigter PDI vorgesehen, dennoch ließ sich damit zeigen, dass auch zellassoziierte PDI dazu in der Lage ist, die Redoxreaktion zwischen Insulin und DTT zu katalysieren.

Nach in 2.8. beschriebener Methode wurden HL60-Zellen über 30 Minuten in Gegenwart von Insulin und DTT inkubiert. Die anschließend detektierte Fluoreszenz bewegte sich mit 9900 ± 4400 Fluoreszenzeinheiten (FE) auf dem Niveau von 2-4 Units rekombinanter PDI (siehe 3.1.). Abzüglich des Leerwerts von 1800 FE verbleiben 8100 FE, die allein zellvermittelter Thiolisomerasen-Aktivität zuzuschreiben sind (n=8).

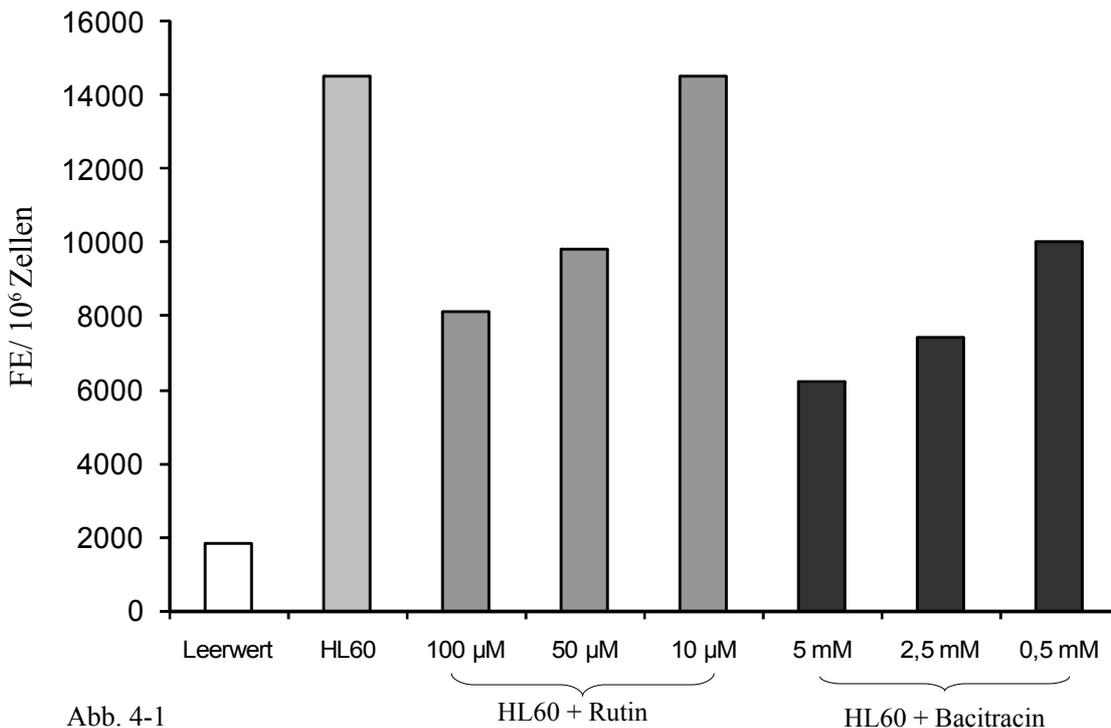


Abb. 4-1

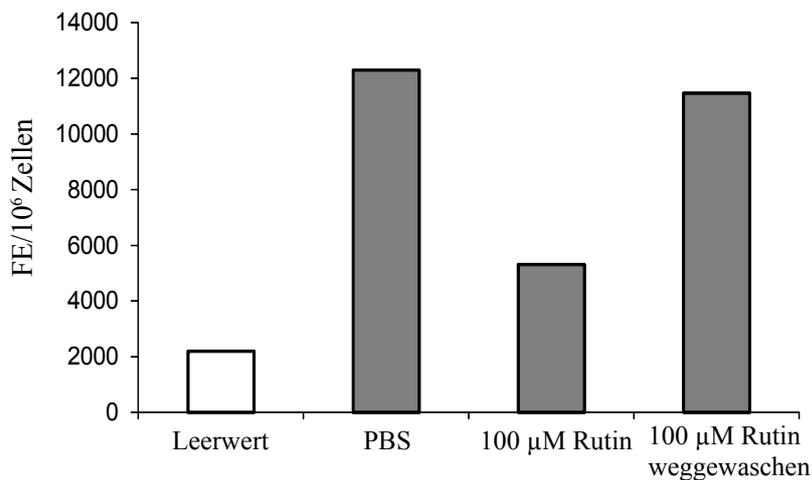


Abb. 4-2

In 4-1A sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments dargestellt. Die PDI-Aktivität auf HL60-Zellen spiegelt sich in den deutlich erhöhten FE-Werten im Vergleich zu Kontrollprobe ohne Zellen (PBS) wider. In Gegenwart von Rutin und Bacitracin zeigt sich konzentrationsabhängig eine Abnahme der PDI-Aktivität. Wie Abb. 4-1B zeigt, war die Wirkung des Rutins in einem repräsentativen Experiment nach einmaligem Waschen der Zellen aufgehoben.

Durch Co-Inkubation mit Rutin oder Bacitracin nahm die von den Zellen erzeugte Fluoreszenz deutlich ab. Dieser Effekt erwies sich als konzentrationsabhängig.

Mit 5 mM Bacitracin ließen sich 75 % der PDI-Aktivität hemmen, mit 100 µM Rutin kam es zu einer Hemmung der Aktivität um 49 % (siehe Abb. 4-1). Damit scheint das unspezifische Bacitracin im Vergleich zu Rutin ein effektiverer Inhibitor zellassoziierter Thiolisomerasen-Aktivität zu sein. Der Effekt des Rutins ließ sich durch einmaliges Waschen wieder aufheben (siehe Abb. 4-2).

Mit Zellen der Linie THP1 wurden analoge Experimente durchgeführt, deren Daten

hier nicht gezeigt sind. Es zeigte sich in vergleichbarem Maße eine Thiolisomerasen-Aktivität (10^6 THP1-Zellen mit 8600 ± 3300 FE), die sensibel auf den Einsatz von PDI-Inhibitoren ist (4300 ± 3200 FE bei $100 \mu\text{M}$ Rutin, 2400 ± 900 FE bei 5 mM Bacitracin, $n=3$)

Aus diesem Ergebnis lässt sich ableiten, dass auf der Oberfläche von HL60- und THP1-Zellen Thiolisomerasen-Aktivität vorhanden ist und dass sich diese sowohl durch Rutin als auch durch Bacitracin effektiv hemmen lässt. Rutin und Bacitracin sind also geeignete Substanzen, um die Auswirkungen einer PDI-Hemmung auf den zellulären Stoffwechsel zu untersuchen.

3.5. Veränderungen auf HL60-Zellen nach 20-minütiger Inkubation mit einem PDI-Inhibitor

Die HL60-Zellen wurden in einer Dichte von $1,0 \times 10^6$ Zellen/ml gemeinsam mit $100 \mu\text{M}$ Rutin beziehungsweise 5 mM Bacitracin 20 min lang bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen im einstufigen Gerinnungstest am KC 10 auf ihre prokoagulatorische Aktivität hin untersucht.

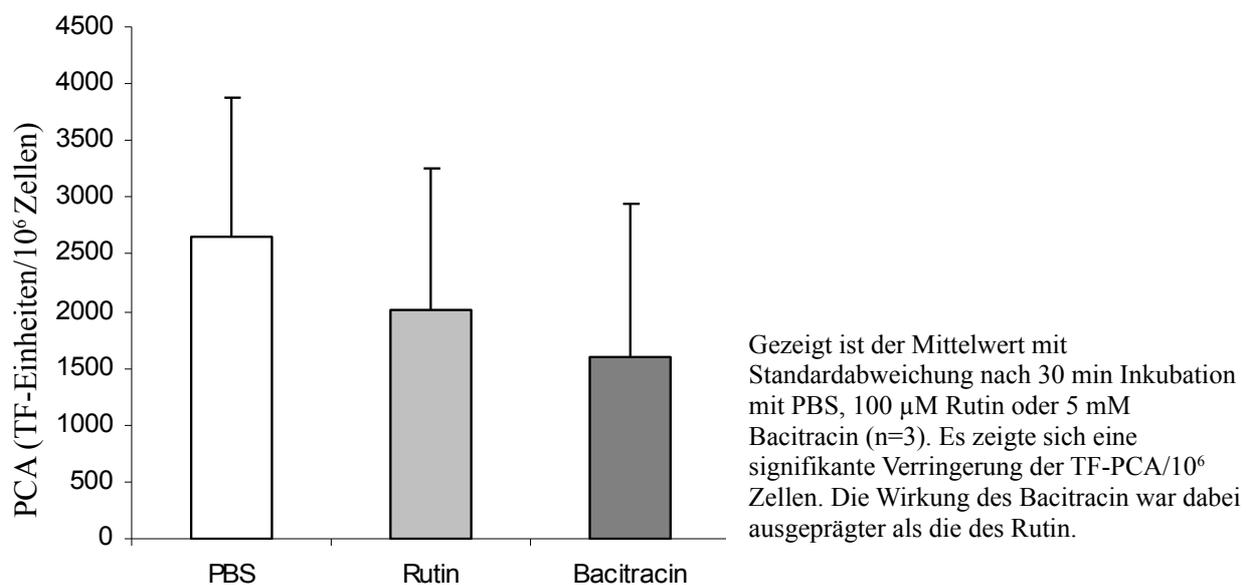


Abb. 5-1

Wie in Abb. 5-1 zu sehen ist, kam es auf HL60-Zellen in Gegenwart von $100 \mu\text{M}$ Rutin und 5 mM Bacitracin zu einer Verringerung der TF-PCA. Die Verringerung durch $100 \mu\text{M}$ Rutin bezifferte sich im Mittel auf 2000 ± 1300 TF-Einheiten gegenüber 2700 ± 1200 TF-Einheiten im Kontrollansatz mit PBS, was einem Rückgang von 26% entspricht. Mit einem p-Wert von $<0,05$ bei $n=8$ Versuchen ist der Rückgang auch statistisch

signifikant. Durch 5 mM Bacitracin reduzierte sich die TF-Aktivität noch wirksamer auf 1600 ± 1300 TF-Einheiten. Dies entspricht einem Rückgang um 40%, der mit einem p-Wert von $<0,05$ bei $n=3$ Versuchen ebenfalls statistisch signifikant ist. Bei beiden Hemmstoffen liegt eine Abhängigkeit des Effekts von der eingesetzten Dosis vor (siehe Abb. 5-2 A und B). Der Effekt des Rutin (Abb. 5-2 C) und des Bacitracin (Daten nicht gezeigt) konnte durch einmaliges Waschen wieder rückgängig gemacht werden. Die TF-Aktivierung durch Rutin bzw. Bacitracin erwies sich somit als potentiell reversibel.

Eine Hemmung der PDI auf Myeloblasten führt also nach 20 min zu einer Abnahme der zellassoziierten TF-PCA. Dieses Ergebnis zeigt, dass die PCA, die von zellulärem TF unter standardisierten Versuchsbedingungen ausgeht, maßgeblich von der PDI-Aktivität abhängig ist.

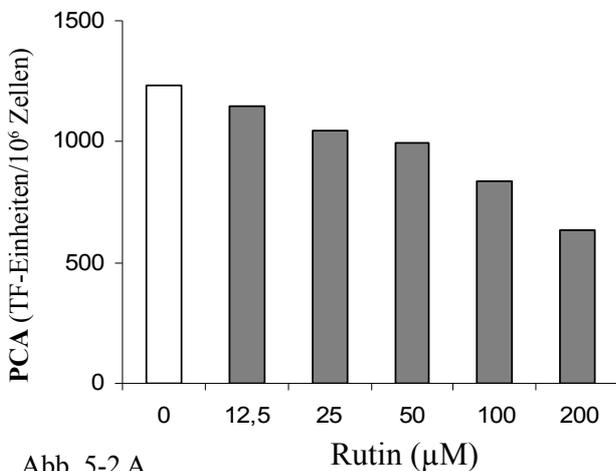


Abb. 5-2 A

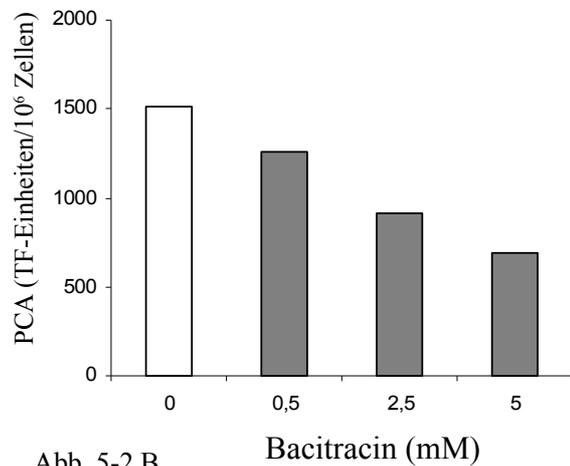


Abb. 5-2 B

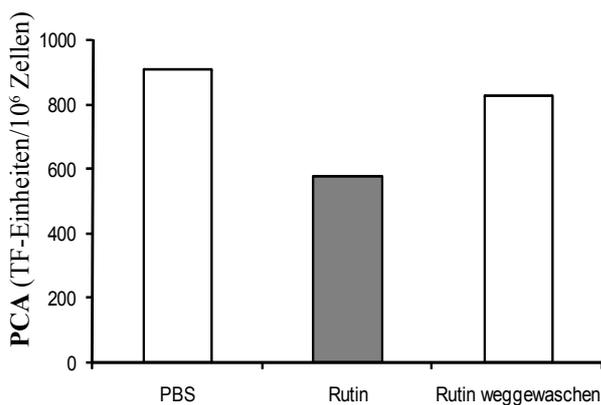


Abb. 5-2 C

Dargestellt sind die Ergebnisse jeweils eines repräsentativen Experiments. Der Effekt von Rutin und Bacitracin auf die Anzahl der TF-Einheiten stellte sich jeweils konzentrationsabhängig ein (Abb. 5-2 A und B). Dabei war der Effekt des Rutin nach einmaligem Waschen der Zellen aufgehoben (Abb. 5-2 C).

3.6. Veränderungen auf HL60-Zellen durch eine 24-stündige Inkubation mit PDI-Inhibitoren

Nachdem eine 20-minütige Inkubation zu einer verringerten Anzahl an TF-Einheiten geführt hatte, sollte der Effekt einer Langzeitinkubation über 24 h mit einem PDI-Inhibitor auf die prokoagulatorische Aktivität des TF auf Myeloblasten untersucht werden. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, zum Zeitpunkt des Inkubationsbeginns betrug die Zelldichte $1,0 \times 10^6$ Zellen/ml. Verglichen wurden Proben, die mit 100 µM Rutin beziehungsweise 5 mM Bacitracin inkubiert worden waren, gegenüber einer Probe, der stattdessen lediglich PBS zugegeben worden war.

3.6.1. Entwicklung der Zellzahl

Zum Zeitpunkt des Inkubationsbeginns belief sich die Zellzahl $1,0 \times 10^6$ Zellen/ml. Am Ende der Inkubation wurde die Zellzahl der Proben erneut in einem Gerät für automatische Zellzahlbestimmung ermittelt (n=6).

Proben ohne PDI-Inhibitor zeichneten sich während der 24 h Inkubation durch eine hohe Proliferationsrate aus und konnten ihre Zellzahl durchschnittlich um dem Faktor $1,9 \pm 0,4$ erhöhen. In Proben mit 100 µM Rutin bzw. 5 mM Bacitracin war die Zellvermehrung hingegen geringer ausgeprägt. In Gegenwart von Rutin nahm die Zellzahl nur um den Faktor $1,3 \pm 0,4$ zu, in Gegenwart von Bacitracin verringerte sich die Zellzahl sogar um den Faktor $0,9 \pm 0,2$.

Bei gleichzeitiger Hemmung der PDI konnten die HL60-Zellen also nur eingeschränkt proliferieren.

3.6.2. Zellassozierte TF-PCA

Die Anzahl der TF-Einheiten in den unterschiedlichen Proben wurde am Ende der 24 h-Inkubation im einstufigen Gerinnungstest am KC10 erfasst.

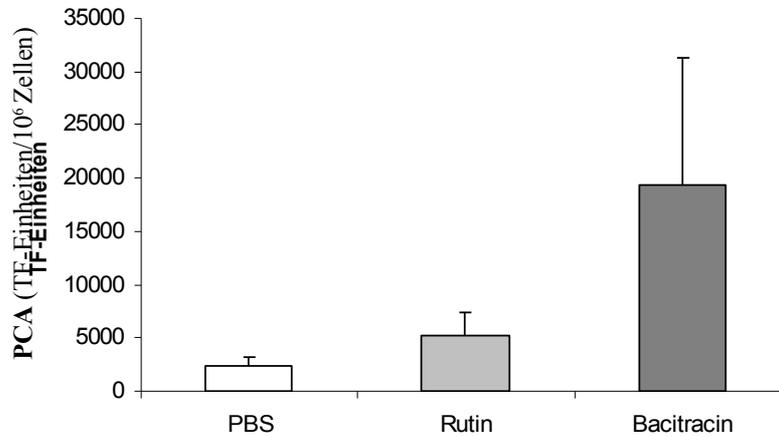


Abb. 6-1 A

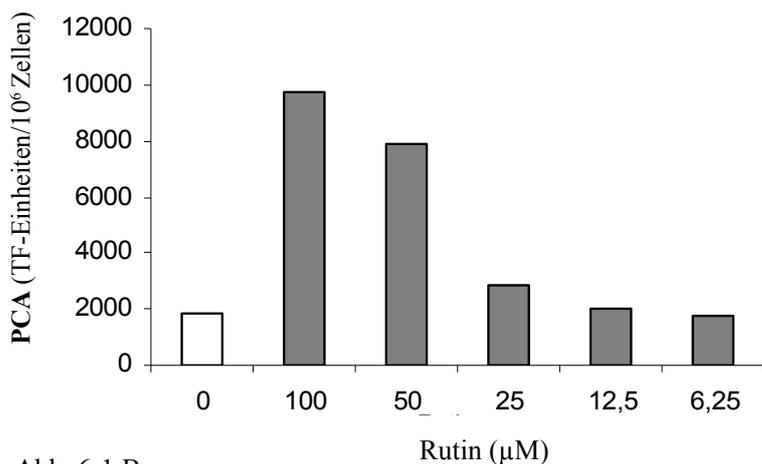


Abb. 6-1 B

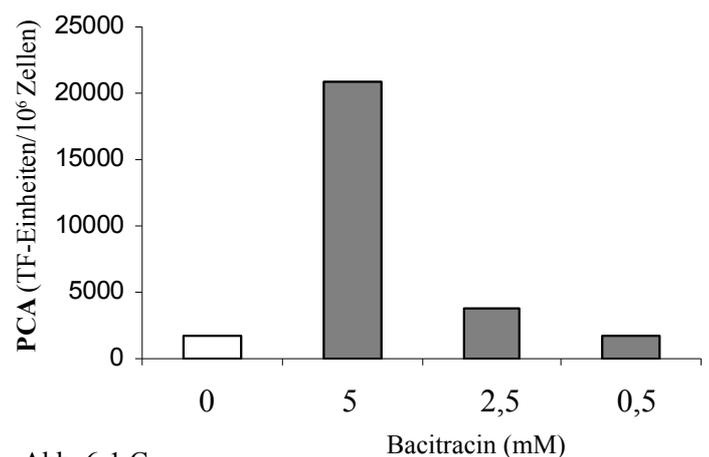


Abb. 6-1 C

In Abb. 6-1 A dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus n=28 (PBS und 100 µM Rutin) bzw. n=14 Experimenten (5 mM Bacitracin). Die Inkubation mit den PDI-Inhibitoren führte reproduzierbar zu einem Anstieg der TF-PCA bei HL60-Zellen. Mit Bacitracin ließ sich ein stärkerer Anstieg erzielen als mit Rutin. Der Effekt von Rutin und Bacitracin stellte sich jeweils konzentrationsabhängig ein (Abb. 6-1 B und C).

Überraschenderweise fand sich eine Diskrepanz zwischen den Veränderungen nach lang- und kurzzeitiger Inkubation mit den PDI-Inhibitoren. Während die Gerinnungsaktivität nach 20minütiger Inkubation nachließ, zeigte sich nach langfristiger Inkubation eine umgekehrte Entwicklung.

Eine 24 h-Inkubation mit 100 µM Rutin führte zu einer Erhöhung der TF-Aktivität um den Faktor 2,3 (5300 ± 2100 TF-Einheiten) gegenüber der Kontrollprobe (2300 ± 800 TF-

Einheiten, $n=28$, $p<0,01$), während die TF-Aktivität nach 24 h Inkubation mit 5 mM Bacitracin sogar um den Faktor 8,3 (19300 ± 12000 ; $n=14$, $p<0,01$) zunahm (siehe Abb. 6-1 A).

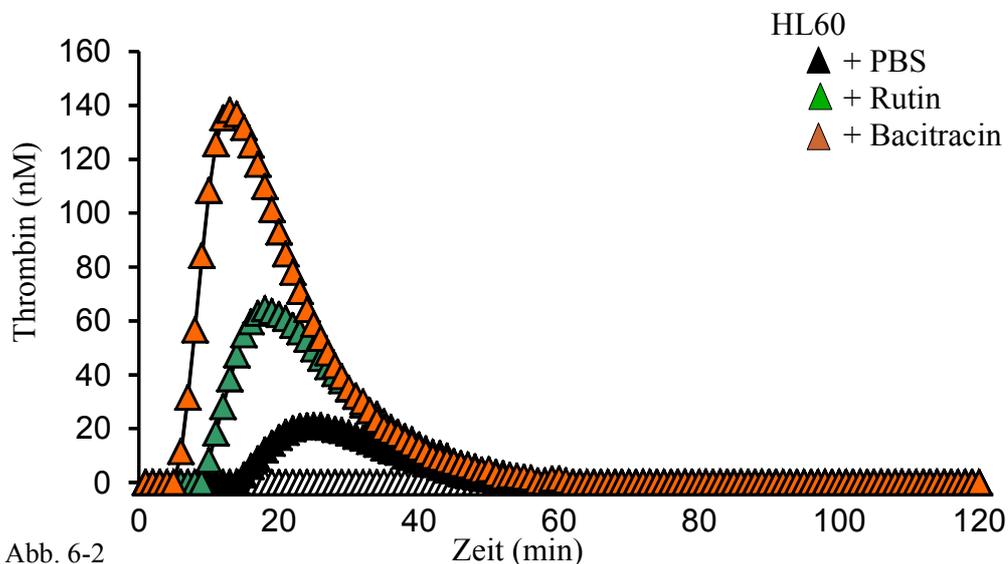
3.6.3. MP-assoziierte TF-PCA

Für das von Myeloblasten ausgehende prokoagulatorische Potential sind die Mikropartikel (MPs) als potentielle Träger von TF von großer Bedeutung.

Die von HL60-Zellen stammenden MPs wurden am Ende der 24-stündigen Inkubation mit Rutin bzw. Bacitracin aus zellfreien Überständen gewonnen. Die Aufreinigung der Mikropartikel erfolgte analog der in 2.3 beschriebenen Methode.

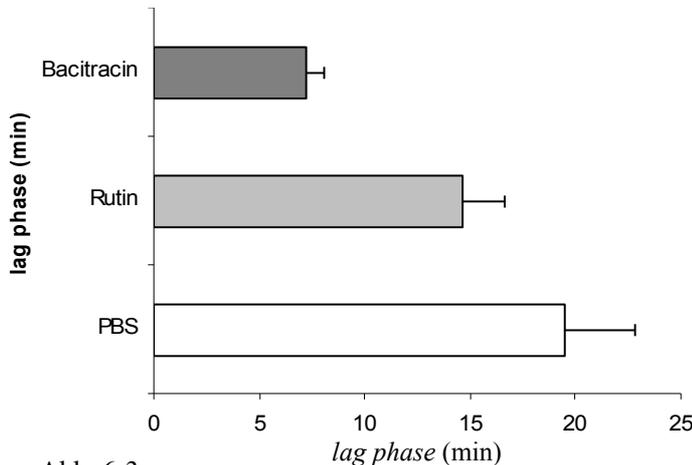
Bei Kontakt der MPs mit rekalkifiziertem Standardhumanplasma, welches durch Ultrazentrifugation von intrinsischen Phospholipiden befreit wurde, kommt es zur Generierung von Thrombin. Nun wurde diese Thrombingenerierung im Zeitverlauf untersucht.

Die folgende Abbildung 6-2 zeigt die Thrombinkonzentration, die durch MPs aus den Proben mit PBS, 100 μ M Rutin und 5 mM Bacitracin generiert wurde, im Zeitverlauf.



Oben dargestellt ist diejenige Thrombinkonzentration, die in einem repräsentativen Experiment durch MPs der Proben mit PBS, 100 μ M Rutin oder 5 mM Bacitracin im Zeitverlauf generiert wurde. Der Einsatz von Bacitracin und Rutin führt zu einem rascheren Einsetzen der Thrombingenerierung im Vergleich zu der Kontrollprobe. Die Thrombingenerierung in der Probe mit 5 mM Bacitracin beginnt dabei noch vor derjenigen mit 100 μ M Rutin.

Die unter 24 h-Inkubation mit 100 μ M Rutin entstandenen Mikropartikel führen zu einem früheren Auftreten von Thrombin, abzulesen am Parameter *lag phase* (Latenzzeit), nach 15 ± 2 min, während die *lag phase* der Kontrollprobe mit PBS 19 ± 3 min beträgt. Durch 5 mM Bacitracin verkürzte sich die *lag phase* sogar auf 7 ± 1 min. Da die Thrombinbildung durch TF initiiert wird, stellt die *lag phase* einen besonders sensitiven Parameter der TF-Aktivität dar (n=17).



Auch diese Abbildung zeigt die *lag phase* als Latenzzeit bis zum Auftreten von Thrombin. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus n=17 Experimenten. Sowohl durch 100 μ M Rutin als auch durch 5 mM Bacitracin verkürzt sich die *lag phase* erheblich gegenüber der Kontrollprobe. Mit Bacitracin lässt sich eine noch deutlichere Verkürzung erreichen als mit Rutin.

Abb. 6-3

Auch das Maximum der zu einem Zeitpunkt generierten Thrombinkonzentration, in Abb. 6-4 A als *peak thrombin* bezeichnet, ist durch 100 μ M Rutin auf 46 ± 23 nM und durch 5 mM Bacitracin auf 166 ± 45 nM erhöht; der Thrombinpeak der PBS-Probe liegt unterdessen bei 21 ± 12 nM.

Die Gesamtkonzentration des im Zeitverlauf generierten Thrombins, dargestellt als *area under the curve* (AUC), bemisst sich in Gegenwart von Rutin auf 1000 ± 470 nM*min und in Gegenwart von Bacitracin auf 2700 ± 390 nM*min; durch die PBS-Probe entstehen dagegen 450 ± 300 nM*min Thrombin (n=17, Abb. 6-4 B).

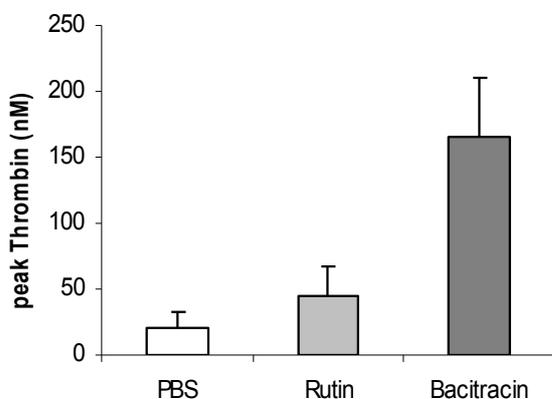


Abb. 6-4 A

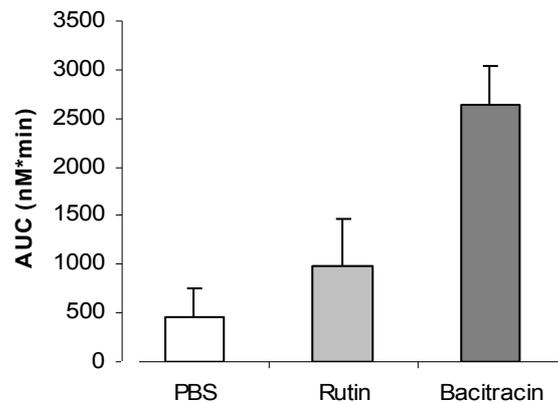


Abb. 6-4 B

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus n=17 Experimenten. MPs aus Proben mit 5 mM Bacitracin und 100 μ M Rutin erzeugten eine höhere maximale Thrombinkonzentration zu einem Zeitpunkt (*peak thrombin*) und eine höhere AUC (insgesamt generierte Thrombinmenge) als diejenigen aus der unbehandelten Probe. Hier ist die Steigerung des Effekts durch Bacitracin im Vergleich zu Rutin besonders deutlich zu sehen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die prokoagulatorische Aktivität von Mikropartikeln, die unter dem Einfluss von Rutin oder Bacitracin freigesetzt wurden, in allen Parametern der Thrombingenerierungsmessung signifikant ($p < 0,01$) erhöht war.

3.6.4. Externalisierung von PS

Nachdem die Langzeitinkubation der HL60-Zellen mit PDI-Inhibitoren eine gesteigerte TF-PCA bei verringerter Zellproliferation sowie vermehrter MP-Freisetzung zur Folge hatte, stellte sich die Frage, ob sich dabei zugleich Veränderungen in der PS-Expression ergeben hatten. Die Zellen wurden zu diesem Zweck über 15 min mit FITC-konjugiertem Annexin V in einer kalziumhaltigen Pufferlösung inkubiert. Das Protein Annexin V bindet in Gegenwart von Kalzium mit hoher Sensitivität an PS. Durch FITC-konjugiertes Annexin V ist es daher möglich, Zellen mit PS auf der Oberfläche im Durchflusszytometer zu detektieren.

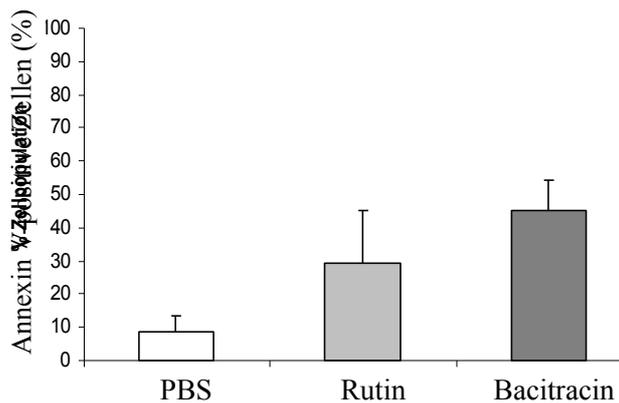


Abb. 6-5 A

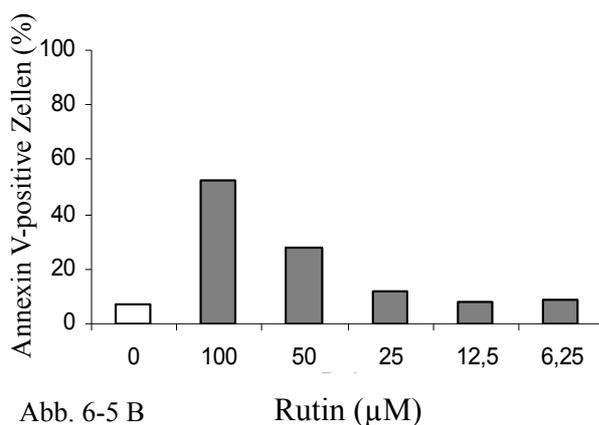


Abb. 6-5 B

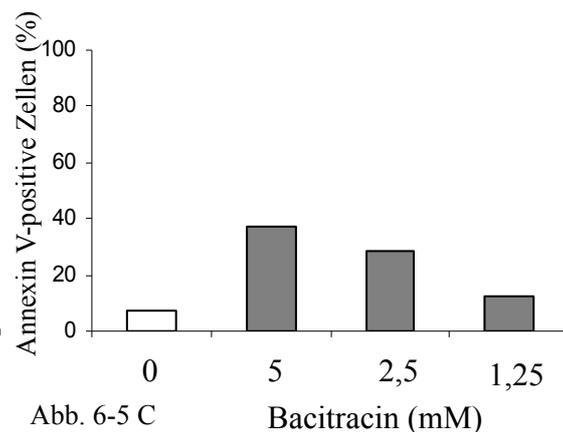
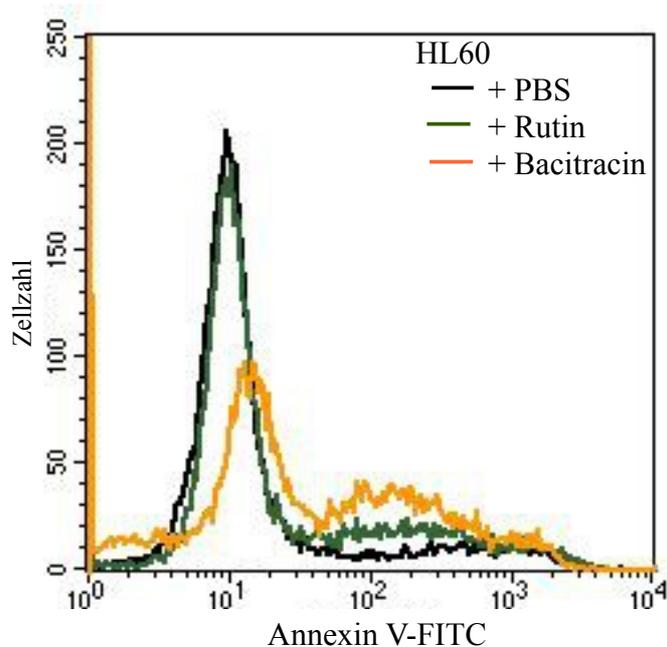


Abb. 6-5 C

Auch ohne Vorbehandlung mit PDI-Inhibitoren (PBS-Probe) war ein gewisser Anteil der Zellen PS-positiv. Dieser Anteil war nach Inkubation mit 100 µM Rutin erhöht. Durch Inkubation mit 5 mM Bacitracin zeigte sich eine noch deutlichere Vergrößerung des Anteils an PS-positiven Zellen. Wie die Abb. 6-5 B und C in je einem repräsentativen Experiment zeigen, war die Vergrößerung der PS-positiven Subpopulation durch Rutin bzw. Bacitracin ein konzentrationsabhängiger Effekt.

In 6-5 A dargestellt ist derjenige prozentuale Anteil der Zellpopulation, an den Annexin V nach Inkubationsende binden konnte. Diese Subpopulation wurde als PS-positiv gewertet. Der PS-positive Anteil erhöhte sich durch 100 μ M Rutin im Durchschnitt um den Faktor 3,3 im Vergleich zur PBS-Kontrolle (29 ± 16 % versus 9 ± 4 %; $n=16$; $p<0,01$); durch 5 mM Bacitracin verfünffachte sich dieser Anteil sogar (45 ± 9 %; $n=6$; $p<0,01$). Es handelt sich hierbei um dosisabhängige Effekte (Abb. 6-5 B und C).



Dargestellt ist ein repräsentatives Histogramm von HL60-Zellen nach 24 h Inkubation mit PBS, 100 μ M Rutin bzw. 5 mM Bacitracin. Die Zahl der Annexin V-markierten und damit PS-positiven Zellen war nach Inkubation mit 100 μ M Rutin bzw. 5 mM Bacitracin gegenüber der Kontrollprobe mit PBS erhöht. Der Effekt des Bacitracin war dabei sichtlich noch ausgeprägter als der des Rutin.

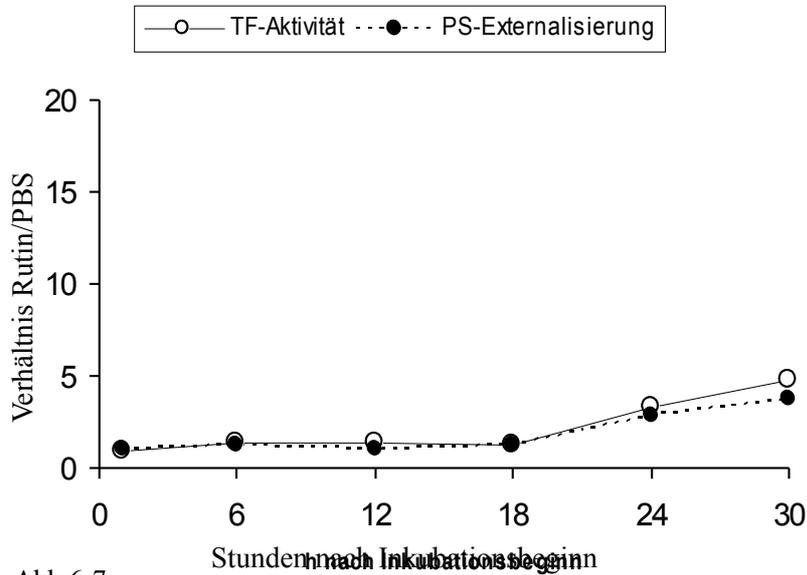
Abb. 6-6

Aus den Abbildungen 6-5 und 6-6 geht hervor, dass sich auf Zellen, die über 24 h mit 5 mM Bacitracin oder 100 μ M Rutin behandelt wurden, mit Hilfe von Annexin V-FITC mehr PS auf der Zelloberfläche finden lässt. Eine langfristige Hemmung der PDI führt also auf HL60-Zellen zu einer vermehrten Externalisierung von PS.

3.6.5. Zeitlicher Verlauf der Veränderungen durch PDI-Inhibitoren

Um den zeitlichen Eintritt der Veränderungen, die sich aus der Inkubation mit den PDI-Inhibitoren Rutin und Bacitracin ergeben, genauer einzugrenzen, und damit die Annahme eines möglichen ursächlichen Zusammenhangs zwischen den beiden Phänomenen TF-Aktivierung und PS-Externalisierung zu untersuchen, wurden in 6 h-Intervallen vom Zeitpunkt des Inkubationsbeginns an sowohl die TF-Aktivität als auch die PS-Expression auf der Zelloberfläche untersucht.

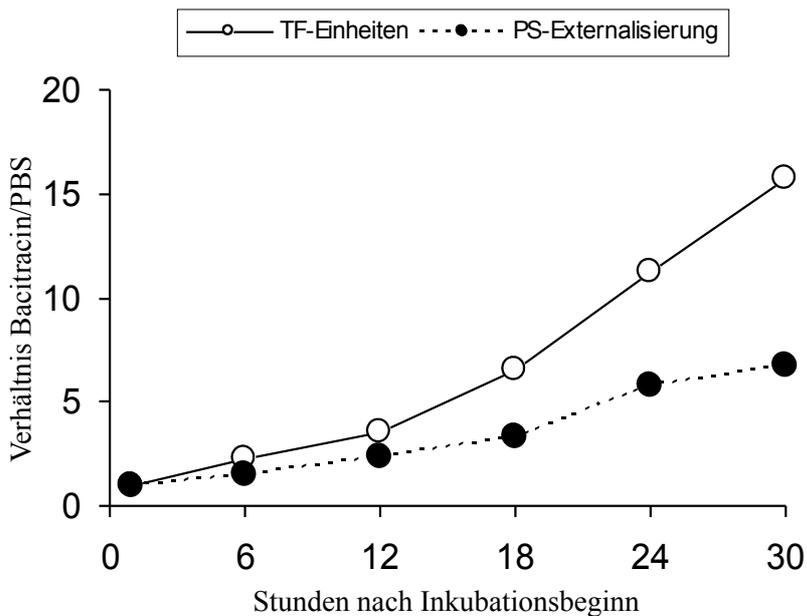
Die Abbildungen 6-7 und 6-8 zeigen, wann die Veränderungen hinsichtlich aktiver TF-Einheiten bzw. PS-Expression bei Inkubation mit Rutin oder Bacitracin eintraten. Dargestellt ist jeweils, inwiefern sich die Anzahl aktiver TF-Einheiten bzw. der Anteil PS-exprimierender Zellen in der Probe mit Rutin (Abb. 6-7) oder Bacitracin (Abb. 6-8) im Verhältnis zu der Vergleichsprobe mit PBS vervielfältigt hat.



Die nebenstehende Abbildung zeigt die TF-PCA bzw. PS-Expression der mit 100 µM Rutin behandelten Probe im Verhältnis zur Kontrollprobe mit PBS im Zeitverlauf in einem repräsentativen Experiment. Die Ausprägung beider Effekte beginnt ab einer Inkubationszeit von etwa 18 h. Es zeigt sich eine nahezu deckungsgleiche Kinetik der beiden Effekte.

Abb.6-7

Die Kinetik dieser Effekte verläuft sichtbar parallel. Nahezu zeitgleich im Intervall zwischen 18 h und 24 h setzen beide Effekte ein und prägen sich im weiteren Zeitverlauf immer deutlicher aus.



Dargestellt ist das Verhältnis der Ergebnisse einer mit 5 mM Bacitracin behandelten Probe zu einer Kontrollprobe in Bezug auf TF-PCA bzw. PS-Expression zu einem Zeitpunkt in einem repräsentativen Experiment. Nahezu zeitgleich wird die Entwicklung beider Effekte ab einer Inkubationszeit von 18 h wesentlich dynamischer.

Abb. 6-8

Die Parallelität der Effekte ist auch im Falle von Bacitracin gegeben. Hier zeichnen sich beide Effekte bereits im Intervall zwischen 12 h und 18 h ab und prägen sich im weiteren Zeitverlauf noch deutlicher aus.

Bei der TF-PCA und der PS-Externalisierung, die aus einer Hemmung der PDI folgen, handelt es sich also um zeitgleich eintretende Veränderungen.

3.6.6. Quantitative Bestimmung von TF auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie

Nachdem sich durch die Langzeitinkubation deutliche Veränderungen in der TF-vermittelten PCA ergeben hatten, sollte untersucht werden, ob sich dabei zugleich auch quantitative Veränderungen in der TF-Expression auf der Zelloberfläche ergeben hatten.

Hierzu wurden die Zellen analog zur in 3.1. bereits angewandten und in 2.5 beschriebenen Methode mit einem TF-Antikörper (Klon HTF-1) oder mit einem unspezifischen IgG zur Kontrolle in einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ 15 Minuten lang inkubiert und anschließend durch Waschen von nicht gebundenen Antikörpern befreit.

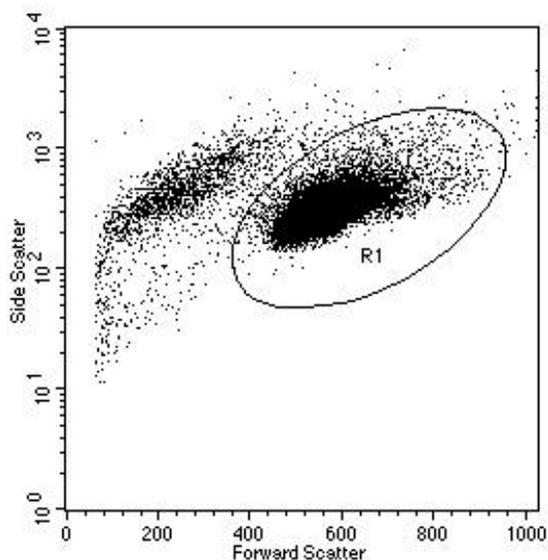


Abb. 6-9 A

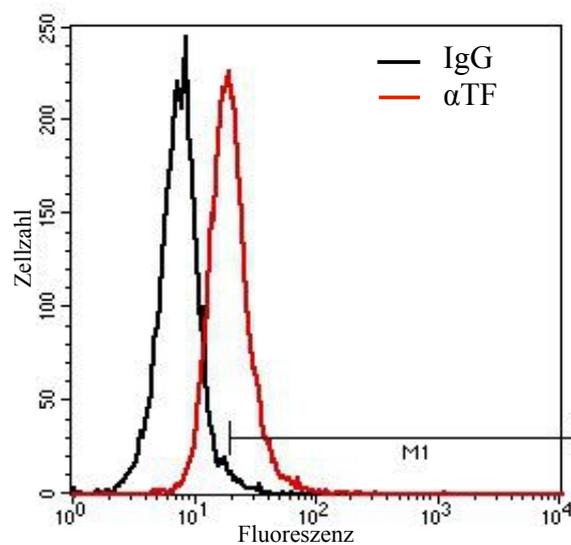


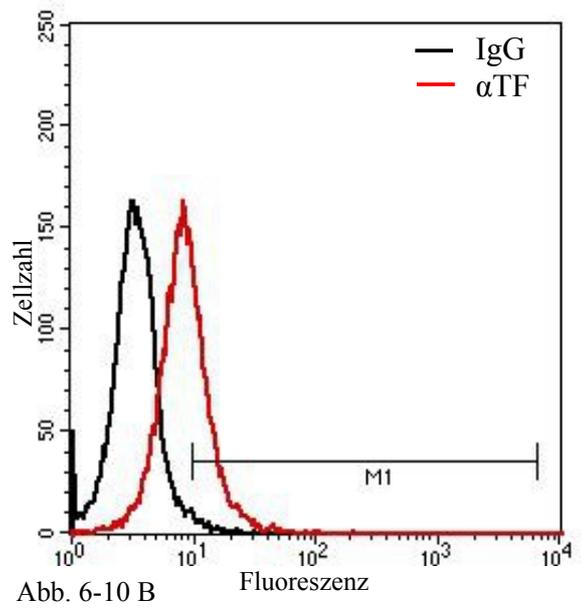
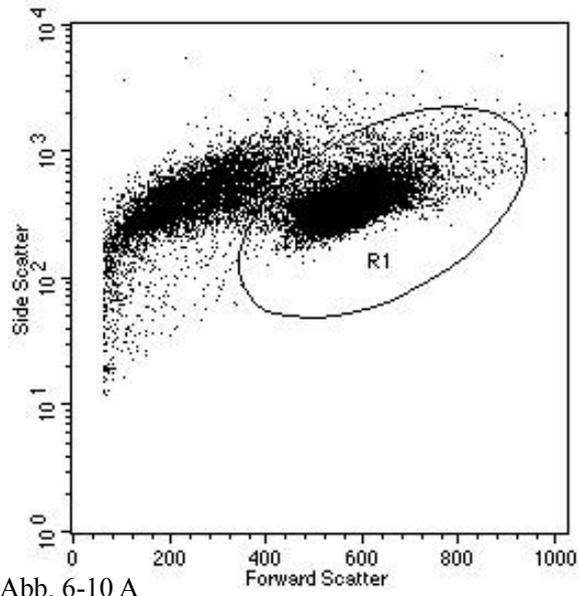
Abb. 6-9 B

Gezeigt ist das Ergebnis eines repräsentativen Experiments. Im *Forward-Side-Scatter* der Abb. 6-9 A ist zu sehen, dass ein Großteil der Zellen (90%, durch den Kreis hervorgehoben) in Abwesenheit eines PDI-Inhibitors eine relativ einheitliche Größe und Morphologie aufweist. Das in 6-9 B gezeigte Histogramm zeigt, dass die mit Anti-TF (αTF) inkubierten Zellen im Vergleich zu mit IgG inkubierten Zellen vermehrt Fluoreszenz emittieren.

Im *Forward-Side-Scatter* (Abb. 6-9 A) lässt sich der Phänotyp der einzelnen Zellen in einer Probe beurteilen. Diese Beurteilung erfolgt anhand des Streulichts, das entsteht, wenn der Laserstrahl des Durchflusszytometers auf eine Zelle fällt. Die hierzu herangezogenen Parameter sind zum einen das Vorwärtsstreulicht (*Forward-Scatter*) als Resultat der Beugung des Strahls im flachen Winkel, das von dem Volumen einer Zelle abhängt, und zum anderen das Seitwärtsstreulicht (*Side-Scatter*) als Resultat der Brechung des Lichts im rechten Winkel, das von der Granularität einer Zelle und der Größe und Struktur ihres Zellkerns abhängt. In der Abbildung 6-9 A gekennzeichnet (R1) sind die nach diesen Kriterien einheitlichen Zellen, die in diesem Fall 90% der Gesamtpopulation ausmachen. Diese Zellen werden im Folgenden vereinfacht als die „unversehrten“ Zellen bezeichnet, da sie keine Veränderungen des Phänotyps aufweisen, wie sie z.B. nach einer Beeinträchtigung des zellulären Metabolismus auftreten. Diese Subpopulation wurde mit Hilfe des PE-konjugierten TF-Antikörpers auf die Expression von TF untersucht. Die so entstandene Fluoreszenzintensität der Zellen ist in Abb. 6-9 B dargestellt. Die Bindung an α TF (29% positive Zellen) war intensiver als die Bindung an unspezifisches IgG (~1%).

Die Zellen der mit 100 μ M Rutin behandelten Probe wurden basierend auf ihrer Präsentation im *Forward-Side-Scatter* in zwei Subpopulationen untergliedert, die in den Abbildungen 6-10 A bzw. C hervorgehoben sind. Verglichen mit der PBS-Probe fand sich ein geringerer Anteil an den sogenannten „unversehrten“ Zellen (69%, in Abb. 6-10 A hervorgehoben) und ein größerer Teil an veränderten Zellen (29%, in Abb. 6-10 C hervorgehoben), die im Vergleich mit den unversehrten Zellen kleiner und etwas verdichtet erscheinen. Diese Zellen sollen im folgenden vereinfacht als die „deformierten“ Zellen bezeichnet werden.

Die deformierten und die unversehrten Zellen wurden separat auf die Bindung des TF-Antikörpers untersucht. Wie in den Abbildungen 6-10 B und D gezeigt, präsentieren sich die unversehrten Zellen zu 30% positiv auf den TF-Antikörper (~1% positiv auf IgG), während die deformierten Zellen eine deutlich verringerte Bindungsrate an α TF (3% positiver Zellen bei 1% positiver Zellen auf IgG) aufwiesen. Gleichzeitig war die unspezifische Antikörper-Bindung bei der deformierten Subpopulation erhöht (siehe Abb. 6-10 D)



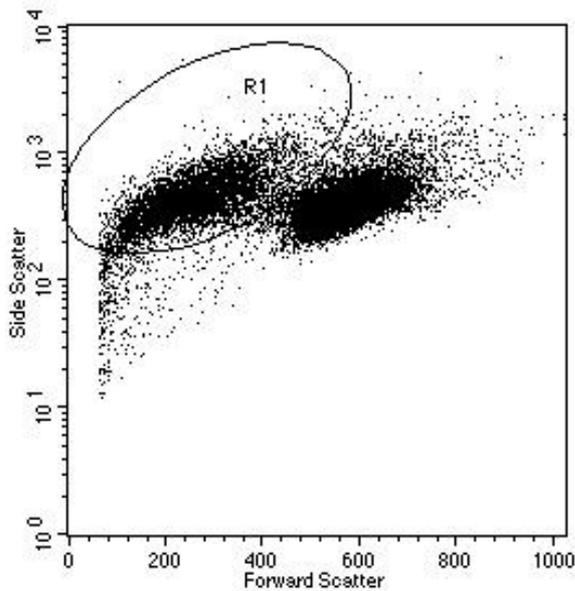


Abb. 6-10 C

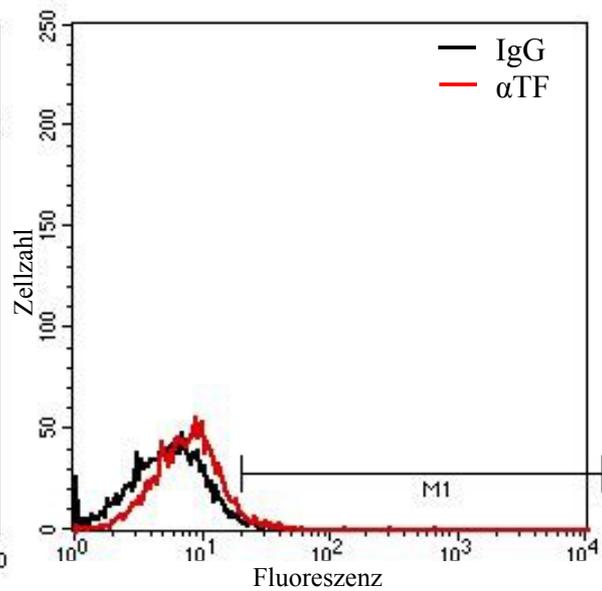


Abb. 6-10 D

Dargestellt ist die Analyse von HL60-Zellen im Durchflusszytometer, die in einem repräsentativen Experiment mit 100 μ M Rutin inkubiert worden waren. Im *Forward-Side-Scatter* (Abb. A und C) zeigt sich durch die Inkubation mit PDI-Inhibitoren eine größere Verteilungsbreite der Zellen. Von den unversehrten Zellen (Abb. B) und den veränderten (Abb. D) wurden separate Histogramme angefertigt. Die unversehrten Zellen zeigen eine mit der unbehandelten Probe vergleichbare α TF-Bindung. Dagegen war die α TF-Bindung auf den veränderten Zellen vermindert bei erhöhter unspezifischer IgG-Bindung.

In der mit Bacitracin behandelten Probe (Abbildungen 6-11 A-F) ließen sich im *Forward-Side-Scatter* drei Subpopulationen unterscheiden. Zusätzlich zu den beiden Subpopulationen, die schon bei der Rutin-Probe auffielen, fand sich noch eine dritte Fraktion sehr kleiner subzellulärer Elemente von geringer Dichte. Diese dritte Subpopulation wurde als die Population der Mikropartikel gewertet. Auch hier wurden die einzelnen Subpopulationen einzeln auf ihre TF-Expression hin analysiert.

Der Anteil der unversehrten Zellen war auf 56% der Gesamtpopulation noch weiter gesunken. Die TF-Expression dieser Zellen war mit 50% α TF-positiver Zellen (1% positiv auf IgG) gegenüber den entsprechenden Zellen der vorigen Probe erhöht (Abb. 6-11 A und B).

In der zweiten Population der deformierten Zellen, die 34% der Gesamtpopulation ausmachte, war die α TF-Bindung eher gering (6% versus 1% positiv) und damit mit denjenigen der Rutin-Probe vergleichbar (Abb. 6-11 C und D).

Auf der dritten Subpopulation, die als Mikropartikel-Fraktion gewertet werden kann und 10% der Gesamtpopulation ausmachte, war wiederum eine stärkere α TF-Bindung zu verzeichnen (32% α TF versus 1% IgG, siehe Abb. 6-11 E und F).

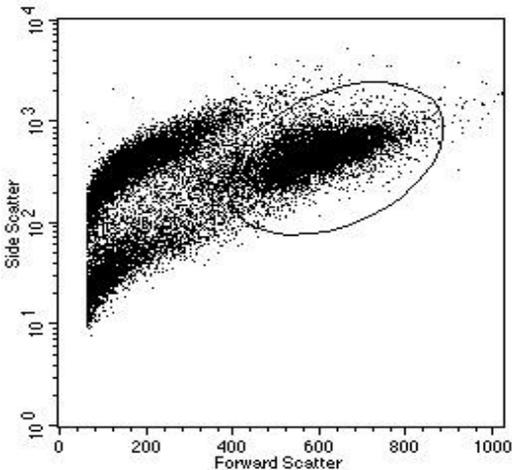


Abb. 6-11 A

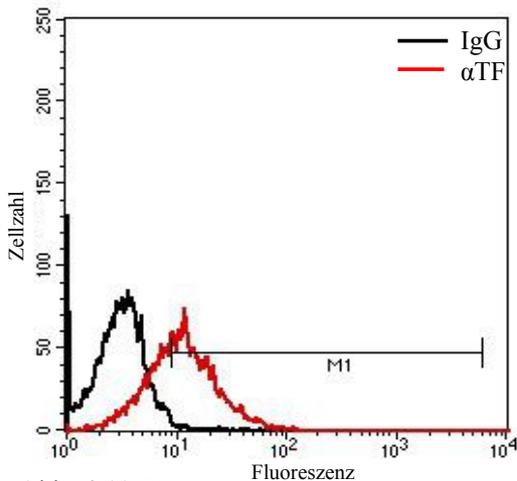


Abb. 6-11 B

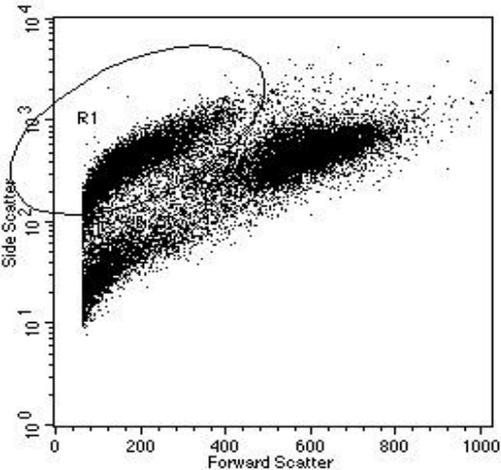


Abb. 6-11 C

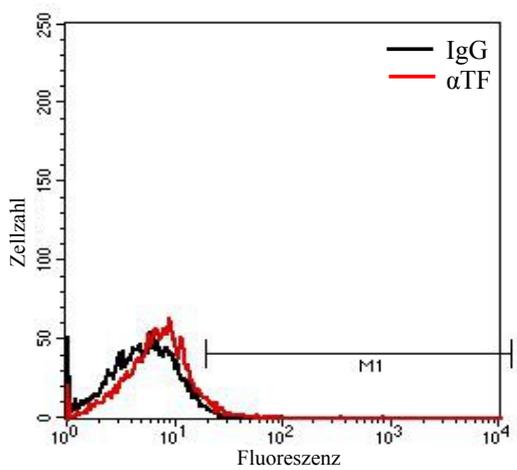


Abb. 6-11 D

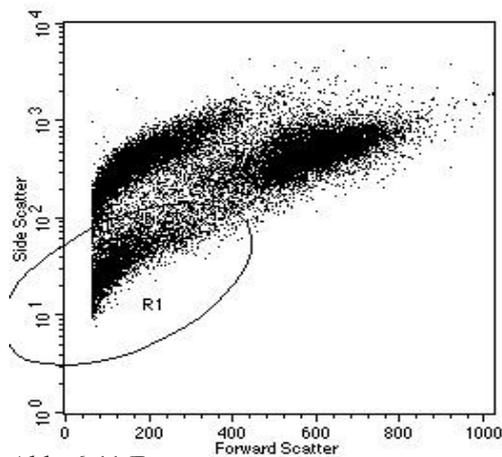


Abb. 6-11 E

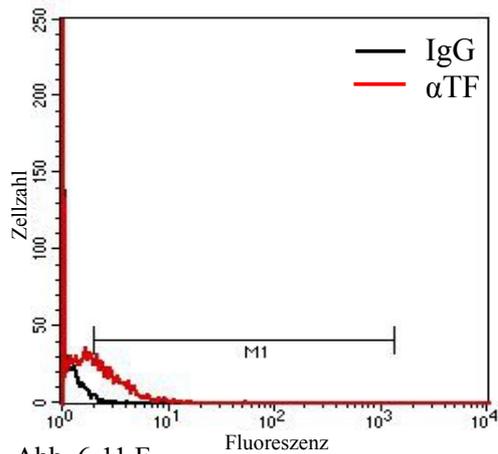


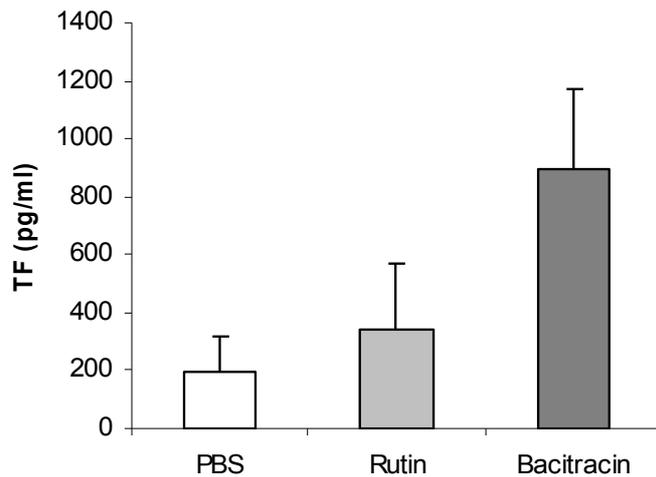
Abb. 6-11 F

Dargestellt ist eine Analyse der HL60-Zellen im Durchflusszytometer nach Inkubation mit 5 mM Bacitracin in einem repräsentativen Experiment. Die Verteilungsbreite der Zellen im *Forward-Side-Scatter* hat verglichen mit der Probe mit Rutin zugenommen. Hier ist noch eine weitere, sehr kleine Population abgrenzbar, die wahrscheinlich die MPs repräsentiert. Die unversehrte Population weist im Histogramm B eine verstärkte α TF-Bindung auf. Auf der in D analysierte Zellpopulation war die α TF-Bindung dagegen geringer. Eine sehr hohe Bindungsintensität war auf der in F dargestellten Fraktion des MPs zu sehen bei ebenfalls vermehrter unspezifischer IgG-Bindung.

Aus diesen Daten und Abbildungen geht hervor, dass die TF-Expression auf HL60-Zellen durch eine Hemmung der PDI veränderbar ist. Gleichzeitig scheint sich der Phänotyp der Zellen zu verändern. Die separate Untersuchung der einzelnen Subpopulationen zeigt, dass die deformierten Zellen im Vergleich zu den unversehrten Zellen eine geringere TF-Expression aufweisen. Da die TF-Expression auf der MP-Fraktion sehr hoch ist, liegt die Interpretation nahe, dass die deformierten Zellen diese TF-positiven MPs freisetzen und daher selbst nur noch über wenig zellulären TF verfügen. Möglicherweise bedingt dieser Vorgang auch die morphologischen Veränderungen dieser Zellen.

3.6.7. Quantitative Bestimmung des TF-Gehalts der Zellen mittels ELISA

Um weiter herauszufinden, ob die unter PDI-Hemmung beobachtete PCA-Steigerung tatsächlich mit einer quantitativen Zunahme TF zusammenhängt, wurde die TF-Expression in HL60-Zellen nach der 24-stündigen Inkubationszeit mit einem kommerziell erworbenen ELISA-Kit untersucht. Durch vorausgegangenenes Lysieren der Zellen mit Triton X-100 wurde TF aus der Membran herausgelöst.



Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=5) der mit Hilfe des ELISA ermittelten TF-Menge auf den Zellen nach Inkubation mit 5 mM Bacitracin, 100 μ M Rutin oder nur PBS. Dabei fand sich unter dem Einfluss der PDI-Inhibitoren ein signifikanter Anstieg der TF-Menge. Die Inkubation mit Bacitracin ergab die effektivere Steigerung des TF-Antigens.

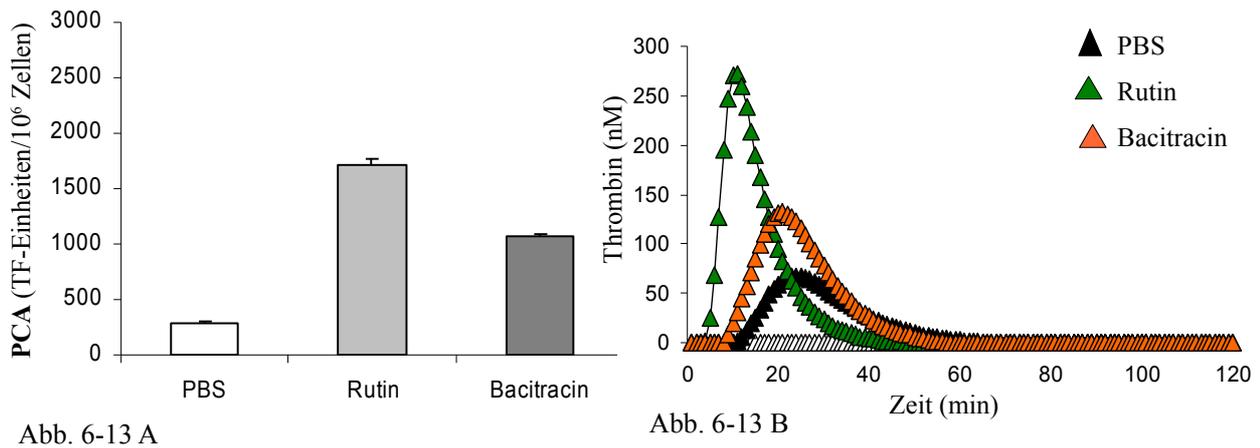
Abb. 6-12

Übereinstimmend mit den Daten aus 3.6.6. ließ sich in diesen Versuchen zeigen, dass der Gehalt an TF in der Zelle insgesamt durch eine 24 h-Inkubation mit einem PDI-Inhibitor ansteigt. Dieser Anstieg beläuft sich durch 100 μ M Rutin auf das 1,7fache und durch 5 mM Bacitracin auf das 4,6fache (Mittelwerte aus n=5 Versuchen). Die Regulation der TF-Expression ist also ein PDI-abhängiger Prozess. Der in 3.6.2. und 3.6.3. beschriebene PCA-Anstieg geht demnach mit einer erhöhten TF-Antigenität in den Zellen einher.

3.6.8. Ergebnisse eines Versuchs mit Myeloblasten eines AML-Patienten

Analog zu den Versuchen mit Zellen der Linie HL60 wurden die oben beschriebenen Experimente mit Zellen durchgeführt, die unmittelbar aus dem peripheren Blut eines AML-M2-Patienten entstammten. Die hierbei entstandenen Ergebnisse sind in den Abbildungen 6-13 A und B gezeigt.

Die basale TF-PCA dieser Zellen nach 24 h Inkubation ohne PDI-Inhibitor nur mit PBS betrug am KC10 300 ± 10 TF-Einheiten. Nach 24 h Inkubation mit 100 μ M Rutin stieg die TF-PCA auf 1700 ± 50 TF-Einheiten an, während die 24 h Inkubation mit 5 mM Bacitracin zu einem etwas geringeren Anstieg der TF-PCA auf 1100 ± 10 TF-Einheiten führte. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis war auch die im TGA ermittelte *lag phase* nach Inkubation mit Rutin bzw. Bacitracin gegenüber der Kontrollprobe mit 18 ± 1 min auf $7 \pm 0,5$ min bzw. 14 ± 0 min verkürzt.



Dargestellt sind die Ergebnisse des Experiments mit den AML-M2-Zellen im KC10 (A) und im TGA (B) nach Inkubation mit und ohne PDI-Inhibitoren. In beiden Versuchen zeigte sich unter 100 μ M Rutin eine Erhöhung der TF-Aktivität, die derjenigen unter 5 mM Bacitracin sogar noch überlegen war.

Wenngleich im einstufigen Gerinnungstest und im TGA durch diese Zellen und deren Mikropartikel andere Werte als bei HL60-Zellen gemessen wurden, lässt sich dennoch klar erkennen, dass eine Hemmung der PDI auch auf den leukämischen Zellen dieses Patienten nach 24 h zu einer Zunahme der TF-PCA führte.

3.7. Veränderungen auf THP1-Zellen nach Inkubation mit PDI-Inhibitoren

3.7.1. Veränderungen der TF-Aktivität durch Inkubation mit Rutin oder Bacitracin allein

Weder eine kurzfristige noch eine langfristige Inkubation mit 100 μ M Rutin oder 5 mM Bacitracin führte zu einer bedeutsamen Veränderung der TF-Aktivität.

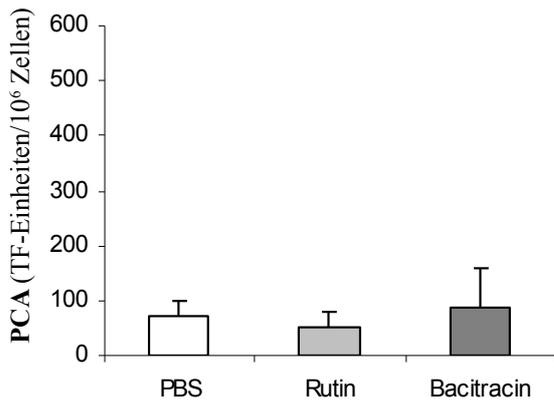


Abb. 7-1 A

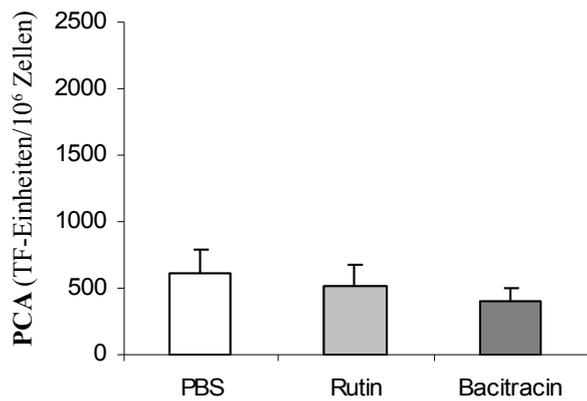


Abb. 7-1 B

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Proben am KC10 nach Inkubation über 20 min (A) bzw. 24 h (B) der THP1-Zellen mit PBS, 100 μ M Rutin oder 5 mM Bacitracin. Der Einfluss beider PDI-Inhibitoren auf die TF-PCA ist nach kurzer ebenso wie nach langer Inkubation gering bis nicht vorhanden. (Abb. 7-1 A: n=4, Abb 7-1 B n= 24 (Rutin) bzw. n=3 (Bacitracin))

Wie in 3.2. gezeigt, wird auf der Oberfläche der THP1-Zellen im Vergleich zu den HL60-Zellen nur sehr wenig TF exprimiert. Entsprechend lässt sich auf diesen Zellen am KC10 nur eine geringe basale TF-Aktivität messen.

Nach 24 h-Inkubation mit einem PDI-Inhibitor nimmt diese Aktivität, wenn auch nur marginal, noch weiter ab. Die Messung am KC10 ergab in Proben, denen nur PBS anstelle eines PDI-Inhibitors zugegeben worden war, 600 ± 170 TF-Einheiten und 520 ± 160 TF-Einheiten in Proben nach Behandlung mit 100 μ M Rutin. Beide Angaben beziehen sich auf n=24 unabhängige Versuche. Durch Inkubation mit 5 mM Bacitracin lässt die TF-Aktivität auf 410 ± 100 TF-Einheiten nach (n=3). Dieser Effekt ist allerdings nicht von statistischer Signifikanz.

Die Messungen am Durchflusszytometer zeigten keine Veränderungen in der PS-Expression nach 24 h-Inkubation mit 100 μ M Rutin oder 5 mM Bacitracin alleine (Daten hier nicht gezeigt), was mit den am KC 10 erzielten Ergebnissen gut vereinbar ist.

Rutin als spezifischer und Bacitracin als eher unspezifischer PDI-Inhibitor haben also nach 24 h-Inkubation auf die TF-Aktivität der THP1-Zellen keinen statistisch signifikanten Effekt. Die Veränderungen nach kurzfristiger Inkubation über 20 min sind zu vernachlässigen und erreichen ebenfalls keine statistische Signifikanz (70 ± 50 TF-Einheiten mit PBS, 50 ± 30 TF-Einheiten mit 100 μ M Rutin, 90 ± 70 TF-Einheiten mit 5 mM Bacitracin).

3.7.2. Wirkung von Daunorubicin auf THP1-Zellen

Da die PDI-Inhibitoren alleine keinen Einfluss auf die TF-PCA der THP1-Zellen ausübten, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob sich durch eine Hemmung der PDI eine Modifikation der Zytostatika-induzierte PCA-Steigerung ergab.

Nach 24 h-Inkubation mit dem Chemotherapeutikum Daunorubicin (DNR, 1 μ M) gehen 40 ± 13 % der THP1-Zellen in die Apoptose über, wie sich über das Bindungsmuster von Annexin V an das im Rahmen der Apoptose externalisierte Phosphatidylserin nachweisen lässt. Verglichen mit einer nur PBS-behandelten Probe mit einem Anteil von 5 ± 2 % apoptotischer Zellen in der Population führt die Behandlung mit DNR also zu einer Verachtfachung der apoptotischen Subpopulation ($n=14$; $p<0,01$). In der Abbildung 7-2 ist exemplarisch das Bindungsmuster von Annexin V-FITC an THP1-Zellen mit und ohne DNR-Behandlung dargestellt.

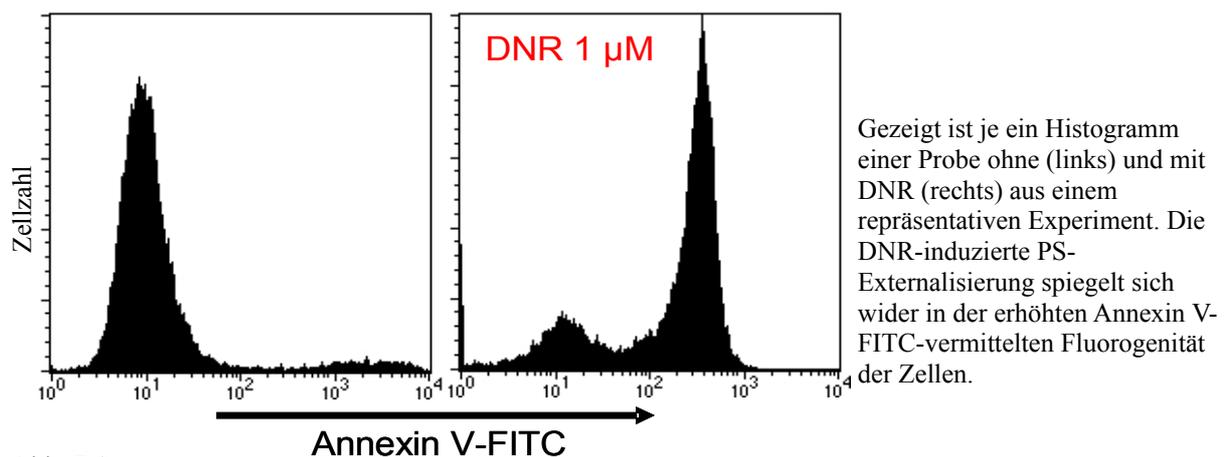


Abb. 7-2

Es ist bereits aus anderen Arbeiten bekannt, dass die DNR-induzierte Apoptose ein potenter Stimulus ist, um eine TF-Aktivierung herbeizuführen (z.B. Langer et al. 2004). Am KC10 wurde zum Ende der Inkubation eine 3fach höhere TF-Aktivität der Probe mit DNR (2000 ± 1050 TF-Einheiten) gegenüber der Probe mit PBS (600 ± 300 TF-Einheiten, $n=20$, $p<0,01$) gemessen.

Als möglicher Hinweis darauf, dass es sich hierbei um eine PDI-vermittelte TF-Aktivierung handelt, zeigt die Abbildung 7-3, dass die Zellen am Ende der Inkubation mit DNR eine intensivere Bindung an den PDI-Antikörper aufwiesen.

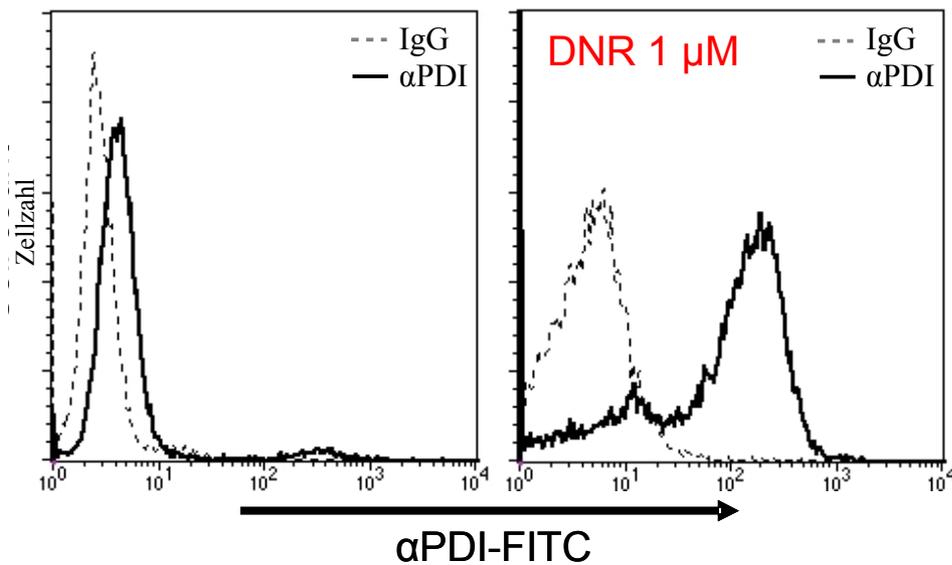


Abb. 7-3

Dargestellt ist je ein ein Histogramm von THP1-Zellen ohne (links) und mit DNR-Behandlung (rechts). Die Bindungsintensität von Zellen an Anti-PDI im Vergleich zu unspezifischem IgG ist nach Inkubation mit DNR deutlich erhöht

Auch im Insulinreduktionsassay war nach Inkubation mit DNR eine vermehrte zellassozierte Thiolisomerasenaktivität zu messen. Durch DNR-behandelte Zellen waren in einem repräsentativen Experiment 21000 ± 2600 FE zu detektieren, was gegenüber unbehandelten Zellen (14000 ± 1000 FE) eine Erhöhung um den Faktor 1,5 darstellt (Leerwert 2100 ± 200 FE, n=2).

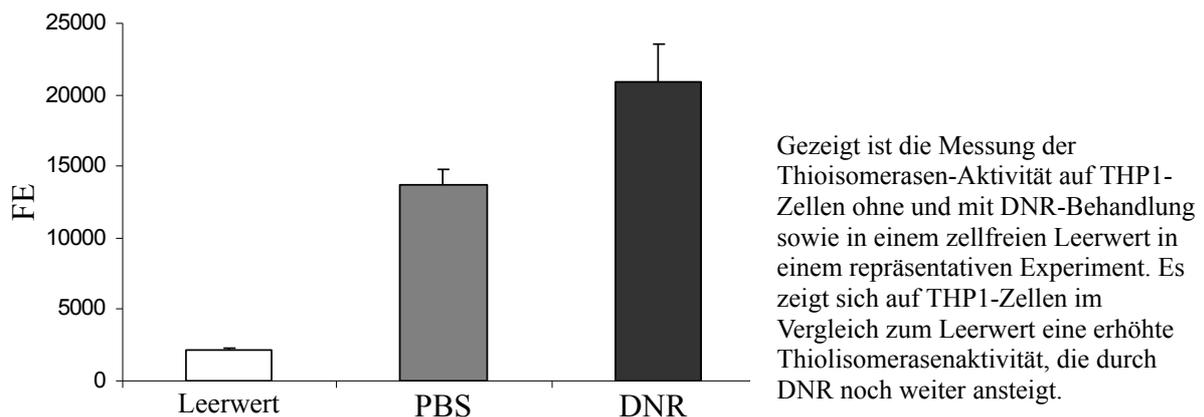


Abb. 7-4

3.7.3. Veränderungen durch eine Co-Inkubation von Daunorubicin und Rutin

Während eine Inkubation mit Rutin alleine, wie in 3.7.1 beschrieben, die TF-Aktivität

auf der Oberfläche von THP-1-Zellen nicht wesentlich beeinflusst, bewirkt eine Co-Inkubation von Rutin mit DNR, dass die TF-Aktivierung, die sich nach 24 h normalerweise unter dem Chemotherapeutikum einstellt, teilweise ausbleibt.

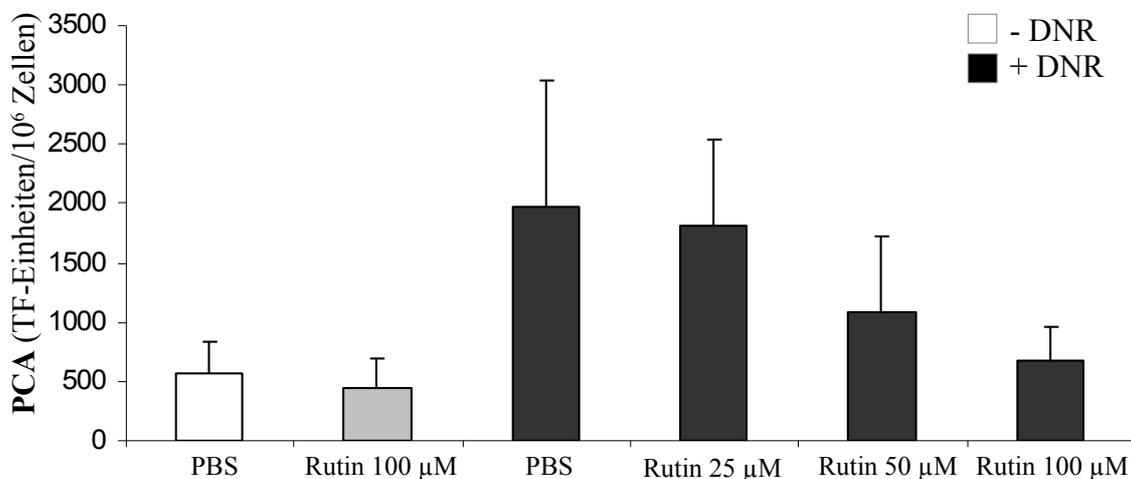


Abb. 7-5

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen der Messungen am KC10 (n=31). THP1-Zellen, die nur mit PBS oder 100 µM Rutin behandelt wurden, zeigen eine geringe TF-Aktivität. Die Zugabe von DNR bewirkt einen deutlichen Anstieg der TF-PCA. Durch Co-Inkubation von DNR mit Rutin lässt sich dieser Anstieg konzentrationsabhängig unterdrücken.

Im einstufigen Gerinnungstest am KC10 zeigte sich 24 h nach Inkubationsbeginn in Abwesenheit von DNR eine TF-Aktivität von 600 ± 300 TF-Einheiten nur mit PBS und 500 ± 200 TF-Einheiten mit 100 µM Rutin. Die Inkubation mit 1 µM DNR bewirkte einen Anstieg der TF-PCA auf 2000 ± 1000 TF-Einheiten. Wurde hingegen zusätzlich zu DNR Rutin zugegeben, fiel dieser Anstieg der TF-PCA weitaus schwächer aus. Dieser abschwächende Effekt von Rutin auf die zytostatikainduzierte TF-Aktivierung ist dosisabhängig (1800 ± 700 TF-Einheiten mit 25 µM Rutin, 1000 ± 600 TF-Einheiten mit 50 µM Rutin, 700 ± 300 TF-Einheiten mit 100 µM Rutin).

Anders als die TF-Aktivierung bleibt die Externalisierung von PS unter DNR von einer Co-Inkubation mit 100 µM Rutin unbeeinflusst (Abb. 7-6 A). Mit einer Subpopulation von $38 \pm 13\%$ apoptotischer Zellen ist die mit DNR und Rutin behandelte Probe mit der mit DNR behandelten Probe ($39 \pm 13\%$) nahezu identisch. Auch aus der Abbildung 7-6 B geht hervor, dass sich das Bindungsmuster von Annexin V an die Zellen, welches auf der Externalisierung von PS beruht, durch die Co-Inkubation mit 100 µM Rutin nicht wesentlich verändert.

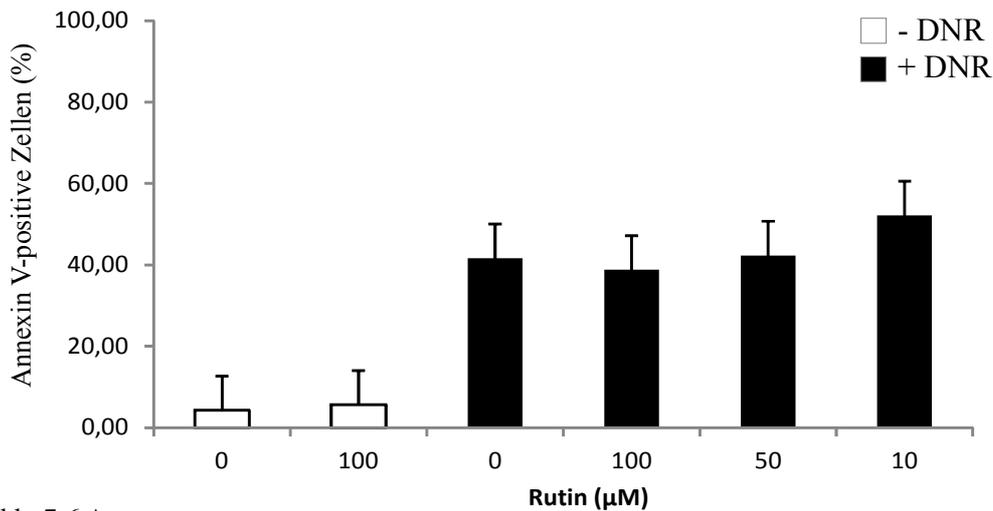


Abb. 7-6 A

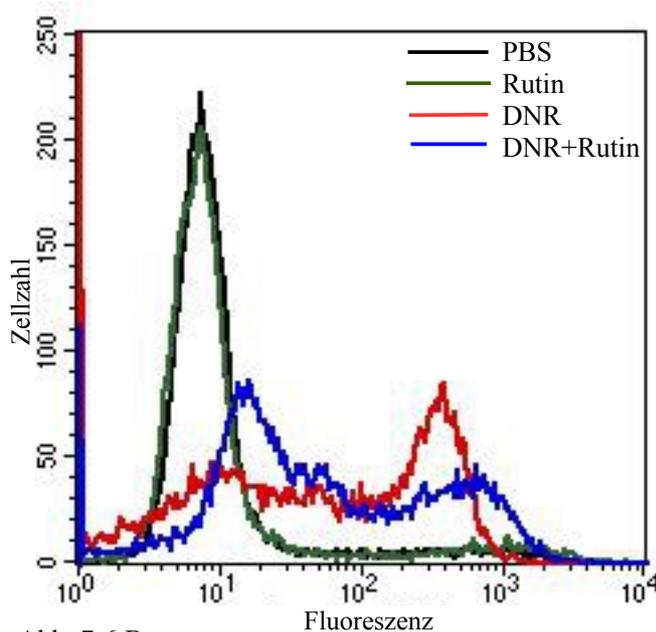


Abb. 7-6 B

Abb. 7-6 A zeigt die Größe der PS-positiven Subpopulation in einer Suspension von THP1-Zellen (Mittelwert mit Standardabweichungen aus n=14). Die Behandlung mit DNR führte zu einem Anstieg der PS-Expression auf den Zellen. Auf diesen Anstieg hatte die Co-Inkubation mit Rutin keinen Einfluss. Im Histogramm in Abb. 7-6 B ist die durchflusszytometrische Analyse der Annexin V-Bindung von THP1-Zellen, die nur mit PBS bzw. 100 µM Rutin, DNR alleine oder DNR + 100 µM Rutin in einem repräsentativen Experiment über 24 h inkubiert worden waren, dargestellt. Die Proben mit lediglich PBS oder Rutin zeigen eine nahezu identische Annexin V-Bindung und damit eine vergleichbare PS-Expression. Durch die Inkubation mit DNR kommt es zu einer wesentlich intensiveren Annexin V-Bindung. Dieser Effekt stellt sich auch nach Co-Inkubation mit Rutin ein.

Es kann also bei gleichzeitiger Hemmung der PDI nicht zu der umfassenden PCA-Steigerung kommen, die DNR üblicherweise induziert, obwohl in unverändertem Maße PS externalisiert wird.

3.7.4. Ergebnisse eines Versuchs mit Myeloblasten eines AML-Patienten

Ähnlich wie bei den HL60-Zellen wurde auch das Reaktionsmuster der THP1-Zellen auf Myeloblasten wiedergefunden, die direkt aus dem Blut von Patienten mit einer AML von Typ M2, M4 und M5 isoliert wurden. Die Versuche mit diesen Zellen wurden dabei analog zu denjenigen mit kultivierten Zellen ausgeführt.

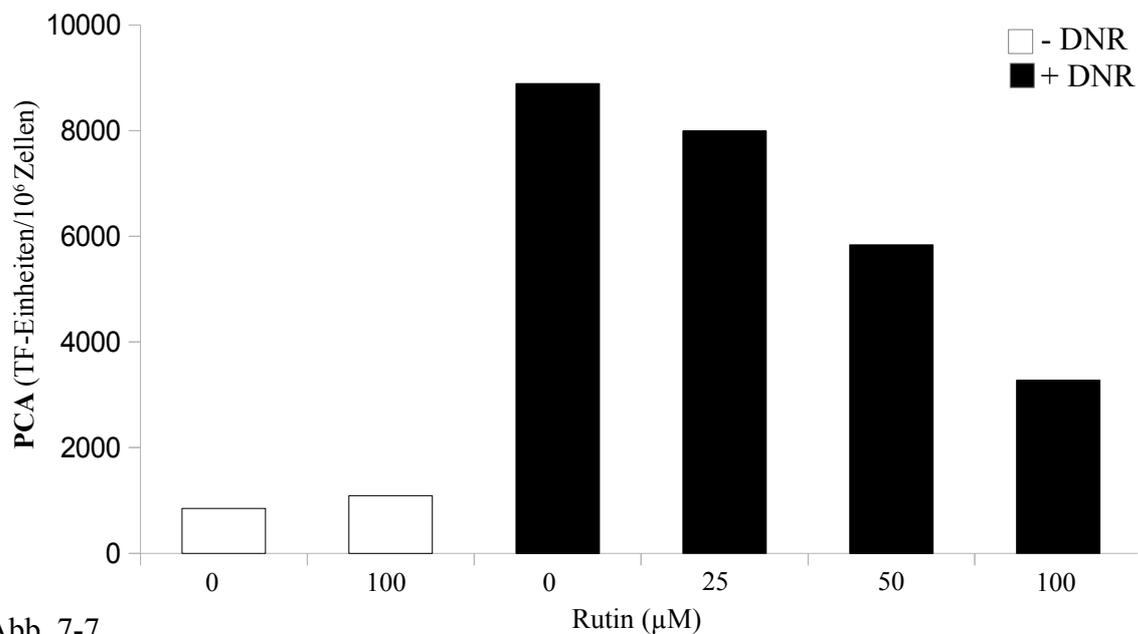


Abb. 7-7

Gezeigt ist die Messung der TF-PCA von AML-M5-Zellen am KC10. Eine Inkubation mit 100 µM Rutin allein verändert die basale TF-PCA nicht. DNR-induziert kommt es zu einem starken Anstieg der TF-PCA, der durch Co-Inkubation mit Rutin dosisabhängig abgeschwächt wird (n=2).

Ausgehend von einer TF-PCA von 850 TF-Einheiten sowie von einer basalen PS-exprimierenden Subpopulation von 51% führte die Inkubation dieser Blasten mit 1 µM DNR zu einem Anstieg der TF-PCA um etwa das Zehnfache (8900 TF-Einheiten) bei gleichzeitiger Vergrößerung der PS-positiven Subpopulation (88%). Während die Behandlung mit 100µM Rutin alleine die zellvermittelte TF-PCA (1100 TF-Einheiten) und PS-Exposition (56%) nur unwesentlich verändert, kann die gleiche Dosis an Rutin bewirken, dass die umfassende TF-PCA-Steigerung unter DNR ausbleibt (3300 TF-Einheiten bei einer Co-Inkubation von DNR und 100µM Rutin). Die PS-Exposition unter DNR-Einfluss bleibt von der Co-Inkubation mit Rutin unverändert (84% positive Zellen).

Es kommt also auf diesen Zellen DNR-induziert zu einem Anstieg der TF-PCA. Durch Co-Inkubation mit Rutin lässt sich dieser Anstieg bei unveränderter PS-Externalisierung dosisabhängig unterdrücken. Eine Hemmung der PDI hat auf die Blasten dieses Patienten also ähnliche Auswirkungen wie auf THP1-Zellen.

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung und Beurteilung

Die bei AML-Patienten so häufigen thromboembolischen Komplikationen und systemische Hämostasestörungen wie tiefe Venenthrombosen, Lungenembolien oder DIC hängen ganz entscheidend mit der Expression von TF auf der Oberfläche der leukämischen Blasten zusammen. TF liegt auf diesen Zellen überwiegend in einer inaktiven, kryptischen Form vor. Durch entsprechende Stimuli wie Apoptoseinduktion durch Chemotherapie lässt sich kryptischer TF allerdings rasch in die aktive Form überführen mit schwerwiegenden

Folgen für die Morbidität und Mortalität dieser Patienten (Kwaan 2007). Es ist jedoch noch immer unklar, welche molekularen Mechanismen für die TF-Aktivierung ausschlaggebend sind.

In diesem Zusammenhang sollten in dieser Arbeit die aktuellen, teils konkurrierenden Konzepte untersucht werden. In erster Linie sollte die Fähigkeit der PDI geprüft werden, auf die TF-Aktivität auf myeloblastischen Zellen Einfluss zu nehmen, nachdem die Rolle der PDI bei der Thrombusformation durch Veröffentlichungen wie die an anderer Stelle beschriebene Arbeit von Reinhardt et al. (2008) zuletzt immer mehr in den Vordergrund getreten ist. Hierzu wurden die PDI-Inhibitoren Rutin und Bacitracin zur Hilfe genommen. Daneben sollte eine Abhängigkeit der TF-Aktivierung von der PS-Externalisierung in Betracht gezogen werden.

Alle hier ausgeführten Schlussfolgerungen beruhen auf Ergebnissen von In-vitro-Experimenten mit den myeloblastischen Zelllinien HL60 und THP1. Da diese Zelllinien, wie in 3.2. gezeigt, TF konstitutiv exprimieren, stellen sie geeignete Modelle zur Validierung der genannten Konzepte dar.

4.1.1. PDI-Aktivität auf der Zelloberfläche

In 3.3. konnte eine Expression der PDI auf der Oberfläche von Zellen der Linie HL60 und THP1 mit einem monoklonalen (RL90) sowie mit einem polyklonalen Antikörper durchflusszytometrisch eindeutig nachgewiesen werden, obwohl das Vorkommen der PDI auf der Zelloberfläche in der Vergangenheit bestritten worden ist. Pendurthi et al. (2007) bezweifeln eine oberflächliche Lokalisation der PDI und berufen sich dabei auf eigene Arbeiten mit unterschiedlichen Zelltypen (Fibroblasten, Mammakarzinomzellen und Endothelzellen), bei denen die Autoren die PDI über Immunfluoreszenz nur auf solchen Zellen detektieren konnten, die zuvor permeabilisiert worden waren. Daraus wurde gefolgert, dass die PDI nur intrazellulär lokalisiert sei.

Es existieren jedoch einige Studien, in denen variable Mengen an PDI auch auf der Oberfläche gefunden wurden. Dies gelang z.B. auf Endothelzellen (Wan et al. 2012), Lymphozyten (Täger et al. 1997) und Thrombozyten (Essex 1995). Wie dies angesichts der C-terminalen ER-Retentionssequenz möglich ist, ist noch unbekannt. Wie die PDI auf der Zelloberfläche verankert ist, bleibt ebenso unklar wie ihr Transportmechanismus an die Membranaußenseite. Es wurde postuliert, dass sie die Oberfläche in Koppelung an ein noch nicht identifiziertes sezerniertes Protein erreicht (Popescu et al. 2011). Komplexe aus TF und

PDI werden zwar beschrieben, dennoch scheidet für diese Autoren TF als primärer Transporter für die PDI aus, da sie die PDI auch auf Zellen mit minimaler TF-Expression nachweisen konnten. Es war in unseren Experimenten dennoch auffällig, dass die Zelllinie HL60 neben einer hohen TF-Expression auch eine hohe PDI-Expression auf der Oberfläche aufweist, während auf der Zelllinie THP1 die TF-Expression genau wie die PDI-Expression geringer ausgeprägt ist. Diese Beobachtung legt einen kausalen Zusammenhang zwischen TF- und PDI-Expression nahe.

Andere Erklärungsmodelle für das Vorkommen der PDI auf der Oberfläche beinhalten einen Abbau des Retentionspeptids und eine begrenzte Synthesekapazität im ER für das Retentionspeptid (Johnson et al. 2001). Als hydrophiles Protein ist eine Insertation der PDI in die lipophile Zellmembran nicht ohne weiteres möglich. Terada et al. (1995) vermuteten eine Bindung der PDI an die Oberfläche auf der Basis von elektrostatischen Interaktionen. Interessanterweise maßen Täger et al. 1997 auf B-CLL-Zellen einen quantitativen Zusammenhang zwischen der Expression von PDI und freien Thiolgruppen. In ähnlicher Weise fanden Lawrence et al. 1996 auf Lymphozyten eine positive Korrelation zwischen der Menge an oberflächlicher PDI und der Anzahl an freien Thiolgruppen fanden.

Nachdem unsere durchflusszytometrischen Daten eine oberflächliche Expression der PDI bestätigten (3.3.), sollte der Frage nachgegangen werden, ob in dieser Lokalisation auch eine enzymatische Aktivität der PDI vorliegt. Mit dem Insulinreduktionsassay ist dies hier erstmals gelungen (3.4.). Nach vorausgegangener Titration konnte durch Einsetzen einer Zellkonzentration von $1,0 \times 10^6$ Zellen/ml eine Thiolisomerasenaktivität gemessen werden, die der Aktivität von 2-4 Einheiten rekombinanter PDI entspricht. Diese enzymatische Aktivität zeigte sich sensibel auf den Einsatz der in 3.1. als PDI-Inhibitoren charakterisierten Substanzen Rutin und Bacitracin. Zwar sollten Aussagen über den Nachweis einer katalytische Aktivität der PDI nur mit Vorsicht getroffen werden, da auch andere Proteine wie z.B. Integrine (O'Neill et al. 2000), Fibronectin (Langenbach et Sottile 1999) oder Thyroglobulin (Klein et al. 2000) eine PDI-Aktivität imitieren können, doch die Hemmbarkeit durch den hochspezifischen PDI-Inhibitor Rutin ermöglichte eine sichere Identifikation der PDI als Objekt unserer Messungen.

Daraus lässt sich ableiten, dass auf den hier verwendeten Myeloblasten PDI-Aktivität auf der Oberfläche vorliegt, und dass Rutin und Bacitracin geeignete Substanzen sind, um diese Aktivität zu hemmen. Durch Einsatz dieser Substanzen konnte also untersucht werden, welche Auswirkungen eine PDI-Ausschaltung auf die Zellphysiologie hat.

4.1.2. Veränderungen nach Hemmung der PDI

Es stellte sich heraus, dass die PDI-Inhibitoren dosisabhängig auf HL60-Zellen nach 20 min zu einer Abnahme der prokoagulatorischen Aktivität (PCA) führten (siehe 3.5.). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die PDI an der Regulation der TF-Aktivität beteiligt ist und in diesem Fall den prokoagulatorischen Zustand begünstigt. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit anderen Arbeiten, die sich mit dem Zusammenhang von PDI und TF-Aktivität befassen. Auf der Basis einer In-vitro-Studie gelangten Chen et al. 2006 zu der Einschätzung, dass die PDI auf kryptischen TF einen aktivierenden Effekt haben muss, was sich in nachfolgenden Studien reproduzieren ließ (z.B. Reinhardt et al. 2009, Ahamed et al. 2006).

Die rasche Abnahme der TF-PCA nach kurzfristiger PDI-Hemmung in unseren Versuchen steht allerdings in Kontrast zu den Auswirkungen einer langfristigen Inkubation mit PDI-Inhibitoren. Nach 24 h stieg die zellassoziierte und mit Mikropartikeln (MPs) assoziierte PCA deutlich an. Dies war an allen Parametern der PCA-Messung sichtbar: die Anzahl der TF-Einheiten im einstufigen Gerinnungstest war gestiegen, im Assay zur Erfassung der kontinuierlichen Thrombingenerierung durch MPs war die *lag phase* verkürzt, die AUC vergrößert und der *thrombin peak* erhöht. Mit diesem Anstieg geht auch eine vermehrte Externalisierung von PS einher. Es handelte sich in allen Fällen um dosisabhängige Effekte.

Eine genaue Analyse des zeitlichen Verlaufs zeigte, dass diese beiden Veränderungen im gleichen Intervall zwischen 12 und 18 h auftreten. Damit wäre belegt, dass die PS-Exposition bei der TF-Aktivierung in diesem Modell zumindest ein begleitender Mechanismus ist. Ob auch ein kausaler Zusammenhang zwischen den beiden Phänomenen besteht, kann daraus jedoch nicht abgeleitet werden.

Eine weitere Folge der langfristigen Hemmung der PDI-Aktivität waren eine eingeschränkte Proliferation und Vitalität der Zellen. Erneut bestand eine direkte Abhängigkeit des Effekts von der Konzentration des Inhibitors. Diese Beobachtung impliziert, dass die PDI für die ungestörte Vermehrung und das Wachstum der Zellen essentiell sein muss. Direkt zytotoxische Effekte sind sowohl bei Rutin (Marcarini et al. 2011 mit Hepatozyten) als auch bei Bacitracin (Lovat et al. 2008 mit Melanomzellen) unwahrscheinlich, dennoch waren die so behandelten Zellen bei der automatischen Zellzahlbestimmung weniger zahlreich und bei mikroskopischer Betrachtung teilweise pyknotisch und deformiert.

Da alle hier dargelegten Ergebnisse auf In-vitro-Experimenten mit Zellen beruhen, die

seit langer Zeit in Kultur gehalten werden, sind Rückschlüsse auf die im menschlichen Körper stattfindenden Prozesse normalerweise nicht ohne Einschränkung möglich. Mögliche Veränderungen, die in Kultur gehaltene Zellen mit der Zeit durchlaufen, könnten als Störfaktoren zu fehlerhaften Schlussfolgerungen führen. Darüber hinaus unterliegen Zellen im Körper einem komplexeren System an Einflussfaktoren, die sich bei kultivierten Zellen nicht mit berücksichtigen lassen. Daher misst die Tatsache, dass sich die geschilderten Effekte auch auf solchen Zellen reproduzieren ließen, die unmittelbar von Patienten gewonnen wurden, unseren Ergebnissen größere Relevanz bei.

4.1.3. Vergleich der Wirkung von Bacitracin und Rutin

Mit einer basierend auf den Versuchen von 3.1.1. errechneten IC_{50} von $14 \mu\text{M}$ für Rutin bei Inkubation mit 2-4 Einheiten rekombinanter PDI liegt eine gute Übereinstimmung mit der Studie von Jasuja et al. (2012) vor, in der für die IC_{50} von Rutin ein Wert von $6,1 \mu\text{M}$ angegeben wird. Dass der Effekt nach einmaligem Waschen der Zellen vollständig aufgehoben war, bestätigt die Aussage von Jasuja et al., dass es nicht zu einer kovalenten Bindung von Rutin an die PDI kommt und die Hemmung daher reversibel ist.

Die Angaben über eine IC_{50} für Bacitracin hinsichtlich der PDI gehen in der Literatur weit auseinander. Von Dickerhof et al. (2011) werden für diese große Spannbreite die unterschiedlichen Strukturanaloga, als Bacitracin A bis H bezeichnet, verantwortlich gemacht. Von diesen Autoren wurden die einzelnen Strukturanaloga isoliert auf ihre individuelle inhibitorische Potenz hin getestet. Es ergaben sich IC_{50} -Werte von $20 \mu\text{M}$ (Bacitracin H) bis $1050 \mu\text{M}$ (Bacitracin B). In dem hier verwendeten kommerziellen Bacitracin ist Bacitracin A die vorherrschende Variante. Die hierfür errechnete IC_{50} von $600 \mu\text{M}$ liegt eng bei der von Dickerhof et al. für Bacitracin A angegeben IC_{50} von $590 \mu\text{M}$.

Es ist auffällig, dass bei der Langzeitinkubation mit Zellen der Einsatz einer deutlich höheren Bacitracin-Konzentration erforderlich war, um die Wirkung einer PDI-Hemmung zu erzielen. Dies wäre zu erklären mit einer möglichen Metabolisierung dieses Peptids durch unspezifische Peptidasen. Zu einem solchen möglichen Mechanismus liegen in der Literatur allerdings keine Daten vor.

Bei all den geschilderten Veränderungen war der Effekt des Bacitracin auf Zellen im Vergleich zu jenem des Rutin deutlicher ausgeprägt. Dies lässt sich nicht nur bei der Messung der PCA und der PS-Externalisierung beobachten, sondern auch bei der direkten Messung der

PDI-Aktivität auf der Zelloberfläche in 3.4. Die Messung der Aktivität rekombinanter PDI im Insulinreduktionsassay nach Inkubation mit 100 μ M Rutin und 5 mM Bacitracin (siehe 3.1.) ergab jedoch, dass beide Substanzen in dieser Konzentration ausreichend für eine vollständige Hemmung der PDI sind. Eine höhere inhibitorische Potenz des Bacitracin im Vergleich zu Rutin fällt als Ursache für die unterschiedliche Effektivität folglich aus. Diese Beobachtung lässt sich jedoch möglicherweise durch die unterschiedliche Spezifität der beiden Inhibitoren erklären. Während Rutin als hoch selektiver Inhibitor der PDI gilt, kann Bacitracin darüber hinaus andere Enzyme aus der Familie der Thiolisomerasen hemmen. Die Effektsteigerung durch Bacitracin gegenüber Rutin ist demnach durch die Ausschaltung zusätzlicher Thiolisomerasen erklärbar. An der Regulierung des Aktivitätszustands von TF wären also noch andere Thiolisomerasen außer der PDI beteiligt.

4.1.4. Diskrepanzen zwischen den Auswirkungen nach lang- und kurzfristiger Inkubation mit PDI-Inhibitoren

Die moderate PCA-Abnahme auf den HL60-Zellen nach kurzzeitiger Inkubation mit Rutin und Bacitracin steht in offensichtlichem Kontrast zu der deutlichen PCA-Steigerung nach langzeitiger Inkubation. Während der langfristigen Inkubation mit PDI-Inhibitoren war darüber hinaus eine verminderte Proliferation und Vitalität der Zellen zu beobachten. Bei der Betrachtung des Zellphänotyps im Durchflusszytometer imponierte auch eine veränderte Morphologie mit einem erhöhten Anteil an deformierten, verkleinerten Zellen sowie an Mikropartikeln. Begleitet wurde diese Erscheinung von einer vermehrten Externalisierung von PS, was einem Verlust der physiologischen Membranasymmetrie gleichkommt.

Dass diese Folgen auf eine Behinderung der Aktivität intrazellulärer PDI zurückzuführen sind, erscheint unwahrscheinlich, da Rutin als glykosyliertes Molekül und das Polypeptid Bacitracin für die Zellmembran nicht permeabel sein sollten.

Bei der Suche nach einer Erklärung hierfür ist die Externalisierung von PS, die sich nach 24 h-Inkubation ebenfalls einstellt, eine wichtige Beobachtung. Das Erscheinen von PS gilt üblicherweise als ein frühes Zeichen der Apoptose. Es signalisiert der Umgebung, dass die betreffende Zelle im Begriff ist, unterzugehen und vom Immunsystem beseitigt werden kann (Fadok et al. 2001). PS wurde jedoch auch schon auf nicht-apoptotischen, lebendigen Zellen nachgewiesen. Daher werden nun auch Mechanismen der PS-Externalisierung postuliert, die von der Apoptose unabhängig sind. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei der PS-

Externalisierung um einen Prozess handelt, der durch thiolmodifizierende Reagentien beeinflussbar ist (Balasubramanian et al. 2007). Da auch die PDI in Wechselwirkung mit Thiolgruppen steht, könnte sie auf diese Weise an der Aufrechterhaltung der physiologischen Lipidanordnung innerhalb einer Membran beteiligt sein. So ließe sich erklären, dass eine PDI-Hemmung zu einer Störung dieser physiologischen Homöostase führt, was zu einer Externalisierung von PS führt. Infolgedessen könnte PS auf der Zelloberfläche in Interaktionen mit TF treten, die die nach 24h gemessene PCA-Steigerung verursachen.

Es wäre denkbar, dass es sich bei diesem Mechanismus um einen komplexen Vorgang handelt, der erst nach einer Inkubation über viele Stunden – in unseren Versuchen nach ca. 12 h - mit einem PDI-Inhibitor messbar wird. Diejenige PCA-Veränderung, die nach 20minütiger Inkubation mit PDI-Inhibitoren messbar war, basiert dann allein auf der Interaktion der PDI mit TF auf der Oberfläche, während die PCA-Steigerung nach 24 h zusätzlich durch die Externalisierung des PS beeinflusst wird.

4.2. Schlussfolgerungen auf den Mechanismus der TF-Aktivierung

4.2.1. Hintergründe erhöhter TF-vermittelter PCA

Für eine erhöhte zellassozierte PCA gibt es mehrere Erklärungen. Möglich wären eine quantitative Zunahme der TF-Expression durch vermehrte Neusynthese, verändertes Recycling, verminderten Abbau oder Verlagerung von zuvor intrazellulärem TF auf die Außenseite oder aber eine qualitative Veränderung des vorhandenen TF, die zu einer effektiveren Initiierung der Gerinnungskaskade führt.

Prinzipiell wäre die effektive Induktion einer De-novo-Synthese von TF innerhalb weniger Stunden möglich. Bei THP1-Zellen konnte gezeigt werden, dass die TF-Synthese sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller Ebene regulierbar ist (Brand et al. 1991).

Die TF-Expression der HL60-Zellen wurde daher nach Ende der 24 h-Inkubation mit und ohne PDI-Inhibitoren untersucht. Zur Bestimmung der oberflächlichen TF-Expression wurde ein monoklonaler TF-Antikörper eingesetzt, dessen Bindungsverhalten anschließend durchflusszytometrisch beurteilt wurde. Auf morphologisch unveränderten Zellen zeigte sich dabei durch 100 μ M Rutin kein messbarer Zugewinn an TF-Antigen, durch 5 mM Bacitracin

jedoch war die Bindungsintensität des TF-Antikörpers verglichen mit der entsprechenden Zellpopulation aus unbehandelten Proben um den Faktor 1,6 erhöht. Wurden allerdings die morphologisch veränderten Zellen isoliert betrachtet, fiel sowohl in Rutin- als auch in Bacitracin-behandelten Proben eine Verminderung des TF-Antigen auf. Zum Verständnis dieser zunächst erstaunlichen Feststellung war die Betrachtung der MP-Fraktion hilfreich. Diese Fraktion ist unter den mit Bacitracin behandelten Zellen am stärksten vertreten. Bei den mit Rutin behandelten Zellen war sie nur noch sehr diskret vorhanden. Es kann angenommen werden, dass in beiden Fällen umfangreichere MP-Fraktionen vorlagen, die aber bei den vorausgegangenen Waschprozeduren teilweise verloren gingen. Auf diesen MPs war eine erhöhte TF-Expression messbar. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die MPs als TF-exprimierende Fragmente aus der Membran der morphologisch deformierten Zellen abgeschnürt werden. Der so entstehende Verlust erklärt die niedrige TF-Expression auf diesen Zellen.

Die Daten des ELISA, die neben dem oberflächlichen auch potentiell intrazellulären TF mit einbeziehen, deuten darauf hin, dass durch 100 μ M Rutin eine Zunahme an TF um den Faktor 1,7 und durch 5 mM Bacitracin um den Faktor 4,6 stattgefunden hatte. Diese Zuwachsraten der TF-Antigenität liegen damit recht nahe an den Zuwachsraten der TF-PCA (2,3 durch Rutin bzw. 8,4 durch Bacitracin).

In diesem Zusammenhang ist die Betrachtung des zeitlichen Verlaufs hilfreich. In einer Arbeit von Brand et al. (1991) konnte gezeigt werden, dass es nach Stimulation von Monozyten durch LPS schon sehr rasch mit einem Maximum nach 2 h zu einem Anstieg der TF-mRNA in der Zelle sowie zu einer Steigerung der TF-Aktivität mit einem Maximum nach 4-6 h kommt. Da die Veränderungen in unseren Versuchen mit einer sehr viel höheren Latenz (siehe 3.6.5.) auftreten, erscheint es unwahrscheinlich, dass die Zunahme der TF-Expression durch Induktion der TF-Synthese auf genetischer Ebene zustande kommt.

Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass es durch eine 24stündige Hemmung der PDI-Aktivität durch einen noch ungeklärten Mechanismus zu einer gesteigerten TF-Expression in HL60-Zellen kommt. Der TF-PCA-Steigerung liegt also zumindest teilweise eine quantitative Veränderung der TF-Expression zugrunde. Da die Zunahme an PCA diejenige der Antigenität noch weiter übertrifft, müssen qualitative Veränderungen des hier exprimierten TF weiter mit in Betracht gezogen werden.

4.2.2. Regulierung der TF-Aktivität durch die PDI

Die Ergebnisse aus 3.5. und 3.6. lassen zweifelsfrei erkennen, dass die TF-Aktivität durch Hemmung der PDI veränderbar ist.

Bei der Analyse von Konsequenzen aus der PDI-Hemmung muss immer mit bedacht werden, dass die PDI, wie in 1.4.1. erläutert, innerhalb des Zellstoffwechsels zwei Funktionen innehat. Zum einen katalysiert sie als Thiolisomerase Redox-Reaktionen, die für die posttranslationale Modifikation von Proteinen wichtig sind. Darüber hinaus fungiert sie als Chaperon und stellt damit die korrekte Faltung von Proteinen sicher. Beide Funktionen müssen als voneinander unabhängig betrachtet werden, und können auch unterschiedlichen Domänen innerhalb des Enzyms zugeordnet werden (Quan et al. 1995). In beiden Funktionen könnte die PDI auf die Aktivität des TF Einfluss nehmen.

Versteeg et Ruf (2007) erachten die Chaperon-Funktion nach Experimenten mit rekombinanter PDI und löslichem TF als entscheidend. Sie beschreiben eine signifikante Abnahme der TF-PCA bei umfassender Hemmung der PDI durch Bacitracin. Eine selektive Hemmung der Oxidoreduktase-Funktion ohne Beeinträchtigung der Chaperon-Funktion, etwa durch den Thiol-Blocker N-Ethylmaleimid (NEM), blieb dagegen ohne Folgen für die TF-PCA. Sie bezeichnen die PDI daher als ein aktivierendes Chaperon für kryptischen TF, und das Modulieren von TF geschehe z.T. unabhängig von der Oxidoreduktasenaktivität.

Als Angriffspunkt der PDI bei der TF-Umwandlung wird von Ahamed et al. (2006) die allosterische Disulfidbrücke zwischen Cys¹⁸⁶ und Cys²⁰⁹ benannt. Diesen Autoren zufolge befindet sich TF, der an der bezeichneten Stelle oxidiert ist, im prokoagulatorisch aktiven Zustand. Durch diese Disulfidbrücke soll die TF-Struktur insofern verändert sein, dass die Bindungsstellen für die Substrate der Gerinnungskaskade leichter verfügbar sind. Sind die beiden Cysteine hingegen reduziert, ist TF in einem kryptischen Zustand, in dem er für die extrinsische Gerinnung ohne Bedeutung ist, aber noch unverändert weiter als Signalmolekül fungieren kann.

Mit einer In-vivo- und In-vitro-Studie haben Reinhardt et al. (2008) dieses Konzept weiter gestützt. Diese Studie liefert weitere Hinweise darauf, dass der Redoxzustand des TF entscheidend ist, da durch Glutathionierung reduzierter TF kaum prokoagulatorische Aktivität besitzt. Reinhardt et al. gehen davon aus, dass ein Großteil des zellulären TF konstitutiv glutathioniert ist und so die Gerinnungsaktivität zunächst latent bleibt. Der PDI komme dann die Funktion zu, den TF zu deglutathionieren und stattdessen Disulfidbrücken einzufügen. Es stellte sich dabei heraus, dass reduzierte PDI diese Aufgabe effizienter erfüllt als oxidierte PDI.

Um die direkte Interaktion zwischen TF und PDI weiter zu ergründen, wurde in derselben Studie der Einfluss aufgereinigter PDI auf löslichen TF getestet. In der Folge ergab sich eine verminderte Verfügbarkeit freier Thiolgruppen, was sich über Markierung mit MPB nachweisen ließ.

4.2.3. Regulierung der TF-Aktivität durch PS-Externalisierung

Eine reproduzierbare Veränderung durch Langzeitinkubation mit PDI-Inhibitoren auf HL60-Zellen war, wie in 4.1.1. geschildert, die dosisabhängige Externalisierung von PS bei gleichzeitiger ebenfalls dosisabhängiger PCA-Steigerung. Diese Beobachtung weist auf eine Bedeutung der PDI für die Organisation der Membranphospholipide hin. Auf welcher molekularen Interaktion dieser Effekt beruht, bleibt jedoch unklar. Entweder direkt oder über einen zwischengeschalteten Schritt scheint die PDI in den Prozess einzugreifen, bei dem Lipid-Translokasen unter ATP-Aufwand PS auf der Membrannenseite halten (Bever et al. 1996).

Als bisher einzige vergleichbare Arbeit wurde ein solches Resultat von Popescu et al. 2010 bei Experimenten mit Endothelzellen erzielt. Auch hier führte eine antikörpervermittelte Hemmung der PDI nach 20 min zu einem Anstieg der TF-PCA, begleitet von einer erhöhten PS-Expression. Entsprechend fand sich nach exogener PDI-Zugabe eine verringerte TF-PCA bei fehlender PS-Expression. Diese Autoren sehen in diesem Modulieren der PS-Expression ein wichtiges Instrument zur Regulation der TF-Aktivität, da eine gleichzeitige Blockierung des PS durch Annexin V den prokoagulatorischen Effekt um 50% reduzierte.

Auch in anderen Arbeiten wurde bereits demonstriert, dass ein Ausschalten des PS-Einflusses durch Annexin V dazu führt, dass die TF-PCA nach Behandlung mit einem Kalzium-Ionophor nicht mehr in vollem Ausmaß in Erscheinung treten kann (Wolberg et al. 1999). Wenngleich die TF-Aktivierung in diesen Arbeiten durch PS-Blockade mit Annexin V immer zu einem hohen Prozentsatz ausblieb, gelang es nicht, diese vollständig zu unterdrücken. Der Nachweis, dass die Aktivierung des TF funktionell in ausschließlicher Abhängigkeit von der PS-Externalisierung steht, konnte also bisher nicht erbracht werden.

Popescu et al. haben die Bedeutung der PDI für die Veränderungen in der PS-Dynamik auf Endothelzellen genauer untersucht. Sie konnten zeigen, dass Zugabe von rekombinanter PDI die PS-Internalisierung über die hierfür zuständigen Enzyme, die Flippasen, fördert, während sie die Aktivität der Floppasen, die die Verlagerung von PS nach außen katalysieren,

behindert. Es wird darüber hinaus eine signifikant verminderte Flippasen-Aktivität nach 30minütiger Vorinkubation mit α PDI (Klon BD34) im Vergleich zu Kontrollproben beschrieben. Diese Differenz verringerte sich jedoch im Zeitverlauf und war 20 min später nicht mehr vorhanden. Dagegen zeigten die Floppasen nach Vorbehandlung mit α PDI anhaltend eine gesteigerte Aktivität. Die Kinetik der PS-Externalisierung nach PDI-Hemmung in dieser Arbeit unterscheidet sich also deutlich von unseren eigenen Arbeiten. Es ist daher nicht wahrscheinlich, dass unseren Ergebnissen ein identischer Mechanismus zugrunde liegt.

Das Konzept, das der PDI über die Ausbildung von Disulfidbrücken einen Einfluss auf die TF-Aktivität zuschreibt, ist auf teilweise heftigen Widerspruch gestoßen. In einer Arbeit von Pendurthi et al. von 2007, die sich klar gegen eine TF-Aktivierung durch die PDI positioniert, wird die aktivierende Wirkung von Oxidantien wie HgCl_2 auf die Aktivität von zellgebundenem TF zwar ebenfalls dokumentiert, dieses Phänomen wird aber auf die gleichzeitig auftretende Externalisierung von anionischen Lipiden wie PS zurückgeführt. Die Autoren argumentieren auch gegen die Relevanz von Disulfidbrücken im TF, weil sie nach einer Alkylierung von Thiolgruppen mittels MPB (Maleimidopropionylbiocytin) und der Blockierung derselben mit DTNB (Dithionitrobenzoesäure) keine Veränderungen im prokoagulatorischen Verhalten von rekombinantem TF feststellen konnten. Eine Rolle der PDI für die TF-Aktivierung wird hier bestritten, die Autoren vermuten bei den Versuchen, in denen sich Disulfidbrücken und die PDI als maßgeblich erwiesen, eine Verfälschung der Ergebnisse durch Phospholipide.

4.2.4. Einfluss der PDI auf die TF-Aktivität auf THP1-Zellen

Mit den THP1-Zellen wurde die Bedeutung der PDI für die TF-Aktivität in einem zweiten Zellsystem getestet. Hier ergab sich ein ganz anderes Reaktionsmuster.

Im einstufigen Gerinnungstest wurden durch THP1-Zellen schon basal lange Gerinnungszeiten gemessen. Dies korreliert mit der unter 3.2. verzeichneten Aussage, dass auf diesen Zellen verglichen mit Zellen der Linie HL60 nur sehr geringe Mengen TF exprimiert werden. Weder die kurze noch die lange Inkubation mit PDI-Inhibitoren führte zu wesentlichen Veränderungen der zellvermittelten PCA. Die ohnehin geringe TF-Aktivität nimmt in Gegenwart von Rutin und Bacitracin tendenziell sogar noch weiter ab. Damit liegt eine geringfügige Übereinstimmung mit den Beobachtungen auf HL60-Zellen nach

kurzzeitiger PDI-Inhibition vor, nicht aber mit der auffälligen PCA-Zunahme nach langzeitiger Inkubation.

Für die Homöostase von aktivem und kryptischem TF auf der Oberfläche von THP1-Zellen scheint die PDI unter physiologischen Bedingungen also von untergeordneter Bedeutung zu sein. Dies steht in Einklang mit dem in 3.7.2 (Abb. 7-3) erbrachten Nachweis, dass diese Zellen nur geringe Mengen PDI auf der Oberfläche exprimieren.

Wurden die Zellen jedoch über 24 h mit DNR inkubiert, kam es zur Steigerung der PCA um das dreifache. Dies gilt für die zellassozierte ebenso wie die MP-assozierte PCA. Diese Steigerung ist schon aus früheren Arbeiten bekannt, der hier zugrundeliegende Mechanismus gilt aber als nicht gesichert. Dass es zugleich zu einer Externalisierung von PS kam, implizierte einen kausalen Zusammenhang.

Es wurde in einer Arbeit von Martins et al. (2009) beschrieben, dass Tumorzellen bei Einleitung einer Chemotherapie ATP in den Extrazellulärraum freisetzen, welches dann den P2X7-Rezeptor aktivieren kann. Einer Hypothese von Furlan-Freguia et al. (2011) zufolge führt die Aktivierung des P2X7-Rezeptors, vermittelt durch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, zu einer besseren Verfügbarkeit der extrazellulären Thiolgruppen des TF-Moleküls. Auf diese Weise vollziehe sich die plötzliche Steigerung der PCA. In diesen Signalweg soll auch die PDI involviert sein.

Ein relevanter Aspekt in diesem Zusammenhang ist die Messung der PDI-Antigenität und -Aktivität nach einer 24 h-Inkubation mit DNR. Im Rahmen der Apoptoseinduktion durch dieses Chemotherapeutikum kam es zu einer signifikanten Steigerung der messbaren PDI-Aktivität im Vergleich zu intakten Zellen (Abb. 7-4). Gleichzeitig ist auch eine quantitative Erhöhung der PDI-Expression im Durchflusszytometer zu verzeichnen (Abb. 7-3). Damit wäre ein weiterer Hinweis darauf gegeben, dass die PDI bei der Aktivierung des TF eine Rolle spielt.

Es wäre also denkbar, dass es im Rahmen der Apoptose zu einer Verlagerung der PDI auf die Zelloberfläche kommt. Dass eine Externalisierung der PDI möglich ist, wurde 1990 erstmals von Yoshimori et al. bei exokrinen Pankreaszellen dokumentiert. Jasuja et al. gelang es 2010, diesen Prozess auf Endothelzellen durch verschiedene Stimuli, unter anderem Thrombin, auszulösen. Diese Autoren plädieren daher für intrazelluläre Speichervesikel, aus denen die PDI bei Bedarf nach extrazellulär freigesetzt werden kann. Auf diese Weise verlagerte PDI soll auch für die TF-Aktivierung auf Mikropartikeln verantwortlich sein (Reinhardt et al. 2008). Eine durch Apoptose induzierte PDI-Externalisierung, wie sie hier impliziert wird, ist jedoch noch nicht beschrieben.

In 3.7. gelang es, mit den PDI-Inhibitoren Rutin und Bacitracin den Zuwachs an PCA durch DNR dosisabhängig zu unterbinden, wie die Messung der aktiven TF-Einheiten im Einstufengerinnungstest zeigte. Diese Messergebnisse sprechen dafür, dass es sich bei der zytostatikainduzierten PCA-Steigerung um einen durch die PDI vermittelten Prozess handelt. Die PS-Externalisierung blieb von der Gegenwart eines PDI-Inhibitors hingegen unverändert, was gegen die These spricht, dass das Erscheinen von PS allein für die Aktivierung von TF suffizient ist.

Da sich das gleiche Reaktionsmuster auch bei Experimenten mit AML-Zellen wiederfand, die direkt aus Patientenblut isoliert wurden, kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei diesen Ergebnissen um Artefakte handelt, die sich nur auf jahrzehntelang kultivierten Zellen beobachten lassen.

Zusammengenommen deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass sich die TF-Aktivierung als Folge der DNR-Wirkung in Abhängigkeit von der PDI vollzieht, da diese sich nach Hemmung der PDI auch bei unveränderter PS-Expression nicht mehr einstellen konnte.

4.3. Abschließende Beurteilung

Die hier dargelegten Ergebnisse sprechen für eine komplexe Verwicklung der PDI in den Mechanismus der TF-Aktivierung.

Es haben sich auf zwei Subtypen von AML-Zellen unterschiedliche Folgen der PDI-Hemmung ergeben, was zeigt, dass die PDI auf den einzelnen Zelltypen von unterschiedlicher Bedeutung ist. Eine vereinheitlichende Aussage über die Funktion der PDI sollte daher vermieden werden. Während eine Inkubation mit PDI-Inhibitoren auf HL60-Zellen zu einer signifikanten Steigerung der TF-assoziierten prokoagulatorischen Aktivität bei gleichzeitiger PS-Externalisierung und vermehrter TF-Expression führt, bleibt dieselbe Inkubation bei THP1-Zellen ohne Effekt, jedoch kann so die zytostatikainduzierte TF-Aktivierung bei unveränderter PS-Externalisierung eingeschränkt werden.

Da es sich um in vitro gewonnene Erkenntnisse handelt, können sie normalerweise nicht ohne Einschränkungen auf das Verhalten von Myeloblasten im menschlichen Körper übertragen werden. Was aber die Relevanz unserer Ergebnisse unterstreicht, sind Experimente mit Proben, die unmittelbar von AML-Patienten gewonnen wurden. Es lassen sich sowohl das auf HL60- wie auch das auf THP1-Zellen aufgedeckte Reaktionsmuster nach PDI-Hemmung reproduzieren.

Wenngleich die Wirkungsweise der PDI in ihren Einzelheiten noch nicht verstanden ist, offenbaren diese Ergebnisse doch das Potential dieses Enzyms, als medikamentöses Zielobjekt bei der Prophylaxe und Therapie thrombotischer Komplikationen einzelner AML-Patienten hilfreich zu sein.

5. Zusammenfassung

Bei Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie (AML) kommt es überproportional häufig zu systemischen Koagulopathien. Für die Therapie und Prophylaxe dieser Komplikationen wäre ein genaues Verständnis des zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismus wichtig. Es gilt als gesichert, dass einer Überexpression von Tissue Factor (TF), dem physiologischen Initiator der extrinsischen Gerinnungskaskade, auf AML-Zellen eine zentrale Rolle zukommt.

TF kann auf intravaskulären Zellen in einer kryptischen, nicht prokoagulatorischen Form und in einer aktiven, prokoagulatorischen Form vorliegen. Bisher ist nicht bekannt, worin sich die kryptische und die aktive Form strukturell voneinander unterscheiden und

welches die entscheidenden Stimuli zur Umwandlung der kryptischen in die aktive Form sind. Ahamed et al. haben 2006 die These aufgestellt, dass der Aktivitätszustand des TF vom Redoxzustand einer Disulfidbrücke in der extrazellulären Domäne des TF abhängt und dass dieser Redoxzustand durch die Proteindisulfidisomerase (PDI) reguliert wird. Dies wird in anderen Arbeiten wiederum angezweifelt; stattdessen soll die Expression von Phosphatidylserin (PS) der entscheidende Auslöser zur TF-Aktivierung sein.

Diese Erklärungsmodelle sollten an den myeloblastischen Zelllinien HL60 und THP1 untersucht werden. Es sollten die Auswirkungen einer Hemmung der PDI durch den spezifischen Hemmstoff Rutin und durch den unspezifischeren Thiolisomerasen-Hemmer Bacitracin untersucht werden. Die inhibitorische Potenz dieser Hemmstoffen wurde zuvor in einem Insulinreduktions-Assay mit einer IC_{50} für Rutin von 14 μM und für Bacitracin von 600 μM bestätigt. Nach einer Inkubation der HL60-Zellen mit Rutin 100 μM oder Bacitracin 5 mM über 20 Minuten kam es zu einer Abnahme der prokoagulatorischen Aktivität (PCA). Eine Inkubation derselben Zelllinie über 24 h führte dagegen zu einer deutlichen PCA-Steigerung, was sich sowohl in der Messung der direkten zellassozierten PCA als auch in der Messung der PCA der freigesetzten Mikropartikel widerspiegelte. Dieses Phänomen wurde begleitet von einer vermehrten PS-Exposition. Es lässt sich also schlussfolgern, dass die PDI auf diesen Zellen sowohl mit TF als auch mit PS in Wechselwirkung steht. Auf THP1-Zellen ergab weder die 20-minütige noch die 24-stündige Inkubation mit Rutin oder Bacitracin alleine wesentliche Veränderungen der PCA oder der PS-Exposition. Allerdings bewirkte die Gegenwart eines PDI-Inhibitors, dass sich die von dem Chemotherapeutikum Daunorubicin (DNR) normalerweise ausgelöste PCA-Steigerung nicht in vollem Ausmaß einstellen konnte. Auf diesen Zellen ist die PDI unter physiologischen Bedingungen für die TF-PCA ohne Bedeutung, jedoch geschieht die DNR-initiierte PCA-Steigerung offenbar unter Vermittlung der PDI.

Dass das Verhalten beider Zelllinien nach PDI-Hemmung auf AML-Zellen aus Patientenproben reproduziert werden konnte, bestätigt die klinische Relevanz dieser Ergebnisse und macht die PDI zu einem vielversprechenden Angriffspunkt therapeutischer Maßnahmen.

6. Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute Myeloische Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	area under the curve
CaCl _{2t}	Kalziumchlorid
Cys	Cystein
DIC	disseminated intravascular coagulation (Disseminierte Intravasale Koagulopathie)
DNR	Daunorubicin
DTT	Dithiothreitol
EGF-1	Epidermal Growth Factor 1 (Epidermaler Wachstumsfaktor 1)
et al.	et altri
FITC	Fluoreceinthioisocyanat
HgCl ₂	Quecksilber(II)chlorid
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
IgG	Immunglobulin G
IL-1	Interleukin 1
KC10	Kugelkoagulometer
Lys	Lysin
MP	Mikropartikel
MPB	3-N-Maleimidopropionyl-Biocytin
NEM	N-Ethylmaleimid
NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCA	procoagulant activity (Prokoagulatorische Aktivität)
PDI	Proteindisulfidisomerase
PS	Phosphatidylserin
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SHP	Standardhumanplasma
TF	Tissue Factor
TNFα	Tumornekrose-Faktor α

7. Literaturverzeichnis

Ahamed, Jasimuddin; Versteeg, Henri H.; Kerver, Marjolein; Chen, Vivien M.; Mueller, Barbara M.; Hogg, Philip J.; Ruf, Wolfram (2006): Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (38), S. 13932–13937.

Alanen, H. I. (2003): Functional Characterization of ERp18, a New Endoplasmic Reticulum-located Thioredoxin Superfamily Member. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (31), S. 28912–28920.

Bach, R. R. (1988): Initiation of coagulation by tissue factor. In: *CRC Crit. Rev. Biochem.* 23 (4), S. 339–368.

Bach, R. R.; Moldow, C. F. (1997): Mechanism of tissue factor activation on HL-60 cells. In: *Blood* 89 (9), S. 3270–3276.

Bach, Ronald R. (2006): Tissue factor encryption. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26 (3), S. 456–461.

Balasubramanian, Krishnakumar; Mirnikjoo, Banafsheh; Schroit, Alan J. (2007): Regulated externalization of phosphatidylserine at the cell surface: implications for apoptosis. In: *J. Biol. Chem.* 282 (25), S. 18357–18364.

Barbarroja, Nuria; Arístides-Torres, Luis; Hernandez, Vanessa; Martín, Carmen; Dorado, Gabriel; Torres, Antonio et al. (2007): Coordinated deregulation of cellular receptors, proangiogenic factors and intracellular pathways in acute myeloid leukaemia. In: *Leuk. Lymphoma* 48 (6), S. 1187–1199.

Barbui, T.; Falanga, A. (2001): Disseminated intravascular coagulation in acute leukemia. In: *Semin. Thromb. Hemost.* 27 (6), S. 593–604.

Bevers, E. M.; Comfurius, P.; Zwaal, R. F. (1996): Regulatory mechanisms in maintenance and modulation of transmembrane lipid asymmetry: pathophysiological implications. In: *Lupus* 5 (5), S. 480–487.

Bogdanov, Vladimir Y.; Balasubramanian, Viji; Hathcock, James; Vele, Oana; Lieb, Mark; Nemerson, Yale (2003): Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. In: *Nat. Med.* 9 (4), S. 458–462

Bonomini, M.; Sirolli, V.; Settefrati, N.; Dottori, S.; Di Liberato, L.; Arduini, A. (1999): Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in chronic renal failure. In: *J. Am. Soc. Nephrol.* 10 (9), S. 1982–1990.

Brand, K.; Fowler, B. J.; Edgington, T. S.; Mackman, N. (1991): Tissue factor mRNA in THP-1 monocytic cells is regulated at both transcriptional and posttranscriptional levels in response to lipopolysaccharide. In: *Mol. Cell. Biol.* 11 (9), S. 4732–4738.

Carr, M. E. (2001): Diabetes mellitus: a hypercoagulable state. In: *J. Diabetes Complicat.* 15 (1), S. 44–54.

Cermak, J.; Key, N. S.; Bach, R. R.; Balla, J.; Jacob, H. S.; Vercellotti, G. M. (1993): C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor. In: *Blood* 82 (2), S. 513–520.

Chen, Vivien M.; Ahamed, Jasimuddin; Versteeg, Henri H.; Berndt, Michael C.; Ruf, Wolfram; Hogg, Philip J. (2006): Evidence for activation of tissue factor by an allosteric

- disulfide bond. In: *Biochemistry* 45 (39), S. 12020–12028.
- Cho, Jaehyung; Furie, Barbara C.; Coughlin, Shaun R.; Furie, Bruce (2008): A critical role for extracellular protein disulfide isomerase during thrombus formation in mice. In: *J. Clin. Invest.* 118 (3), S. 1123–1131.
- Chu, Arthur J. (2005): Tissue factor mediates inflammation. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 440 (2), S. 123–132.
- Chu, Arthur J. (2011): Tissue Factor, Blood Coagulation, and Beyond: An Overview. In: *International Journal of Inflammation* 2011, S. 1–30.
- Conkling, P. R.; Greenberg, C. S.; Weinberg, J. B. (1988): Tumor necrosis factor induces tissue factor-like activity in human leukemia cell line U937 and peripheral blood monocytes. In: *Blood* 72 (1), S. 128–133.
- Crawley, J.; Lupu, F.; Westmuckett, A. D.; Severs, N. J.; Kakkar, V. V.; Lupu, C. (2000): Expression, localization, and activity of tissue factor pathway inhibitor in normal and atherosclerotic human vessels. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 (5), S. 1362–1373.
- Dickerhof, Nina; Kleffmann, Torsten; Jack, Ralph; McCormick, Sally (2011): Bacitracin inhibits the reductive activity of protein disulfide isomerase by disulfide bond formation with free cysteines in the substrate-binding domain. In: *FEBS J.* 278 (12), S. 2034–2043.
- Dietzen, Dennis J.; Page, Keith L.; Tetzloff, Tina A. (2004): Lipid rafts are necessary for tonic inhibition of cellular tissue factor procoagulant activity. In: *Blood* 103 (8), S. 3038–3044.
- Dixit, Ashish; Chatterjee, Tathagat; Mishra, Pravas; Kannan, Meganathan; Choudhry, Dharma R.; Mahapatra, Manoranjan et al. (2007): Disseminated intravascular coagulation in acute leukemia at presentation and during induction therapy. In: *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 13 (3), S. 292–298.
- Drake, T. A.; Ruf, W.; Morrissey, J. H.; Edgington, T. S. (1989): Functional tissue factor is entirely cell surface expressed on lipopolysaccharide-stimulated human blood monocytes and a constitutively tissue factor-producing neoplastic cell line. In: *J. Cell Biol.* 109 (1), S. 389–395.
- Edwards, R. L.; Rickles, F. R. (1992): The role of leukocytes in the activation of blood coagulation. In: *Semin. Hematol.* 29 (3), S. 202–212.
- Ellgaard, Lars; Ruddock, Lloyd W. (2005): The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. In: *EMBO Rep.* 6 (1), S. 28–32.
- Essex, D. W.; Chen, K.; Swiatkowska, M. (1995): Localization of protein disulfide isomerase to the external surface of the platelet plasma membrane. In: *Blood* 86 (6), S. 2168–2173.
- Fadok, Valerie A.; Bratton, Donna L.; Henson, Peter M. (2001): Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. In: *J. Clin. Invest.* 108 (7), S. 957–962.
- Fleck, R. A.; Rao, L. V.; Rapaport, S. I.; Varki, N. (1990): Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody. In: *Thromb. Res.* 59 (2), S. 421–437.
- Förster, Yvonne; Meye, Axel; Albrecht, Sybille; Schwenzler, Bernd (2006): Tissue factor and tumor: clinical and laboratory aspects. In: *Clin. Chim. Acta* 364 (1-2), S. 12–21.
- Frاند, A. R.; Kaiser, C. A. (1999): Ero1p oxidizes protein disulfide isomerase in a pathway for disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. In: *Mol. Cell* 4 (4), S. 469–477.

- Furlan-Freguia, Christian; Marchese, Patrizia; Gruber, András; Ruggeri, Zaverio M.; Ruf, Wolfram (2011): P2X7 receptor signaling contributes to tissue factor–dependent thrombosis in mice. In: *J. Clin. Invest.* 121 (7), S. 2932–2944.
- Gallagher, R.; Collins, S.; Trujillo, J.; McCredie, K.; Ahearn, M.; Tsai, S. et al. (1979): Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. In: *Blood* 54 (3), S. 713–733.
- Georgopoulos, C. (1992): The emergence of the chaperone machines. In: *Trends Biochem. Sci.* 17 (8), S. 295–299.
- Goplen, Dorota; Wang, Jian; Enger, Per Ø.; Tysnes, Berit B.; Terzis, A. J. A.; Laerum, Ole D.; Bjerkgvig, Rolf (2006): Protein disulfide isomerase expression is related to the invasive properties of malignant glioma. In: *Cancer Res.* 66 (20), S. 9895–9902.
- Goth, S. R.; Stephens, R. S. (2001): Rapid, transient phosphatidylserine externalization induced in host cells by infection with *Chlamydia* spp. In: *Infect. Immun.* 69 (2), S. 1109–1119.
- Greeno, E. W.; Bach, R. R.; Moldow, C. F. (1996): Apoptosis is associated with increased cell surface tissue factor procoagulant activity. In: *Lab. Invest.* 75 (2), S. 281–289.
- Gregory, S. A.; Morrissey, J. H.; Edgington, T. S. (1989): Regulation of tissue factor gene expression in the monocyte procoagulant response to endotoxin. In: *Mol. Cell. Biol.* 9 (6), S. 2752–2755.
- Harlos, K.; Martin, D. M. A.; O'Brien, D. P.; Jones, E. Y.; Stuart, D. I.; Polikarpov, I. et al. (1994): Crystal structure of the extracellular region of human tissue factor. In: *Nature* 370 (6491), S. 662–666.
- Hashida, Tomoyo; Kotake, Yaichiro; Ohta, Shigeru (2011): Protein disulfide isomerase knockdown-induced cell death is cell-line-dependent and involves apoptosis in MCF-7 cells. In: *J Toxicol Sci* 36 (1), S. 1–7.
- Haubold, Katja; Rink, Michael; Spath, Brigitte; Friedrich, Martin; Chun, Felix Kyoung-Hwan; Marx, Guy et al. (2009): Tissue factor procoagulant activity of plasma microparticles is increased in patients with early-stage prostate cancer. In: *Thromb. Haemost.* 101 (6), S. 1147–1155.
- Herbert, J. M.; Savi, P.; Laplace, M. C.; Lale, A. (1992): IL-4 inhibits LPS-, IL-1 beta- and TNF alpha-induced expression of tissue factor in endothelial cells and monocytes. In: *FEBS Lett.* 310 (1), S. 31–33.
- Hölschermann, H.; Terhalle, H. M.; Zakel, U.; Maus, U.; Parviz, B.; Tillmanns, H.; Haberbosch, W. (1999): Monocyte tissue factor expression is enhanced in women who smoke and use oral contraceptives. In: *Thromb. Haemost.* 82 (6), S. 1614–1620.
- Iakhiaev, Alexei; Pendurthi, Usha; Idell, Steven (2004): Asbestos induces tissue factor in Beas-2B human lung bronchial epithelial cells in vitro. In: *Lung* 182 (4), S. 251–264.
- Jasuja, Reema; Furie, Bruce; Furie, Barbara C. (2010): Endothelium-derived but not platelet-derived protein disulfide isomerase is required for thrombus formation in vivo. In: *Blood* 116 (22), S. 4665–4674.
- Jasuja, Reema; Passam, Freda H.; Kennedy, Daniel R.; Kim, Sarah H.; van Hessem, Lotte; Lin, Lin et al. (2012): Protein disulfide isomerase inhibitors constitute a new class of antithrombotic agents. In: *J. Clin. Invest.* 122 (6), S. 2104–2113.
- Kaneko, H.; Kakkar, V. V.; Scully, M. F. (1994): Mercury compounds induce a rapid increase

- in procoagulant activity of monocyte-like U937 cells. In: *Br. J. Haematol.* 87 (1), S. 87–93.
- Karala, Anna-Riikka; Ruddock, Lloyd W. (2010): Bacitracin is not a specific inhibitor of protein disulfide isomerase. In: *FEBS J.* 277 (11), S. 2454–2462.
- Kaushal, Varsha; Mukunyadzi, Perkins; Siegel, Eric R.; Dennis, Richard A.; Johnson, Donald E.; Kohli, Manish (2008): Expression of tissue factor in prostate cancer correlates with malignant phenotype. In: *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 16 (1), S. 1–6.
- Khorana, Alok A.; Francis, Charles W.; Culakova, Eva; Fisher, Richard I.; Kuderer, Nicole M.; Lyman, Gary H. (2006): Thromboembolism in hospitalized neutropenic cancer patients. In: *J. Clin. Oncol.* 24 (3), S. 484–490.
- Klein, M.; Gestmann, I.; Berndorfer, U.; Schmitz, A.; Herzog, V. (2000): The thioredoxin boxes of thyroglobulin: possible implications for intermolecular disulfide bond formation in the follicle lumen. In: *Biol. Chem.* 381 (7), S. 593–601.
- Kossiakoff, A. A.; Somers, W.; Ultsch, M.; Andow, K.; Muller, Y. A.; Vos, A. M. de (1994): Comparison of the intermediate complexes of human growth hormone bound to the human growth hormone and prolactin receptors. In: *Protein Sci.* 3 (10), S. 1697–1705.
- Kothari, Hema; Sen, Prosenjit; Pendurthi, Usha R.; Rao, L. Vijaya Mohan (2008): Bovine protein disulfide isomerase-enhanced tissue factor coagulant function: is phospholipid contaminant in it the real culprit? In: *Blood* 111 (6), S. 3295–3296.
- Kwaan, Hau C. (2007): Double hazard of thrombophilia and bleeding in leukemia. In: *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, S. 151–157.
- Langenbach, K. J.; Sottile, J. (1999): Identification of protein-disulfide isomerase activity in fibronectin. In: *J. Biol. Chem.* 274 (11), S. 7032–7038.
- Langer, F.; Bokemeyer, C. (2012): Crosstalk between cancer and haemostasis. Implications for cancer biology and cancer-associated thrombosis with focus on tissue factor. In: *Hamostaseologie* 32 (2), S. 95–104.
- Langer, Florian; Amirkhosravi, Ali; Loges, Sonja; Meyer, Todd; Eifrig, Barbara; Hossfeld, Dieter K. et al. (2004): An in vitro study on the mechanisms of coagulation activation in acute myelogenous leukemia (AML): role of tissue factor regulation by cytotoxic drugs and GM-CSF. In: *Thromb. Haemost.* 92 (5), S. 1136–1146.
- Langer, Florian; Spath, Brigitte; Fischer, Cornelia; Stolz, Moritz; Ayuk, Francis A.; Kröger, Nicolaus et al. (2013): Rapid activation of monocyte tissue factor by antithymocyte globulin is dependent on complement and protein disulfide isomerase. In: *Blood* 121 (12), S. 2324–2335.
- Langer, Florian; Spath, Brigitte; Haubold, Katja; Holstein, Katharina; Marx, Guy; Wierecky, Jan et al. (2008): Tissue factor procoagulant activity of plasma microparticles in patients with cancer-associated disseminated intravascular coagulation. In: *Ann. Hematol.* 87 (6), S. 451–457.
- Le, D. T.; Rapaport, S. I.; Rao, L. V. (1992): Relations between factor VIIa binding and expression of factor VIIa/tissue factor catalytic activity on cell surfaces. In: *J. Biol. Chem.* 267 (22), S. 15447–15454.
- Lin, M. C.; Almus-Jacobs, F.; Chen, H. H.; Parry, G. C.; Mackman, N.; Shyy, J. Y.; Chien, S. (1997): Shear stress induction of the tissue factor gene. In: *J. Clin. Invest.* 99 (4), S. 737–744.
- Lindberg, J. S.; Kolb, F. O.; Blau, R. A.; Powell, M. R. (1988): Reversal of severe osteopenia in a patient with hyperprolactinemia treated with bromocriptine. In: *West. J. Med.* 149 (3), S.

341–343.

Lovat, Penny E.; Corazzari, Marco; Armstrong, Jane L.; Martin, Shaun; Pagliarini, Vittoria; Hill, David et al. (2008): Increasing melanoma cell death using inhibitors of protein disulfide isomerases to abrogate survival responses to endoplasmic reticulum stress. In: *Cancer Res.* 68 (13), S. 5363–5369.

Ma, Guibo; Liu, Fang; Lv, Linlin; Gao, Yujuan; Su, Yanhua (2013): Increased promyelocytic-derived microparticles: a novel potential factor for coagulopathy in acute promyelocytic leukemia. In: *Ann. Hematol.* 92 (5), S. 645–652.

Mackman, N.; Brand, K.; Edgington, T. S. (1991): Lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the human tissue factor gene in THP-1 monocytic cells requires both activator protein 1 and nuclear factor kappa B binding sites. In: *J. Exp. Med.* 174 (6), S. 1517–1526.

Mandal, Samir K.; Iakhiaev, Alexei; Pendurthi, Usha R.; Rao, L. Vijaya Mohan (2005): Acute cholesterol depletion impairs functional expression of tissue factor in fibroblasts: modulation of tissue factor activity by membrane cholesterol. In: *Blood* 105 (1), S. 153–160.

Mandal, Samir K.; Pendurthi, Usha R.; Rao, L. Vijaya Mohan (2006): Cellular localization and trafficking of tissue factor. In: *Blood* 107 (12), S. 4746–4753.

Manickam, Nagaraj; Sun, Xiuhua; Li, Mengru; Gazitt, Yair; Essex, David W. (2008): Protein disulphide isomerase in platelet function. In: *Br. J. Haematol.* 140 (2), S. 223–229.

Marcarini, Juliana Cristina; Ferreira Tsuboy, Marcela Stefanini; Cabral Luiz, Rodrigo; Regina Ribeiro, Lucia; Beatriz Hoffmann-Campo, Clara; Sérgio Mantovani, Mário (2011): Investigation of cytotoxic, apoptosis-inducing, genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells. In: *Exp. Toxicol. Pathol.* 63 (5), S. 459–465.

Martins, Isabelle; Tesniere, Antoine; Kepp, Oliver; Michaud, Mickael; Schlemmer, Frederic; Senovilla, Laura et al. (2009): Chemotherapy induces ATP release from tumor cells. In: *Cell Cycle* 8 (22), S. 3723–3728.

Maugeri, N.; Brambilla, M.; Camera, M.; Carbone, A.; Tremoli, E.; Donati, M. B. et al. (2006): Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation. In: *J. Thromb. Haemost.* 4 (6), S. 1323–1330.

Maynard, J. R.; Heckman, C. A.; Pitlick, F. A.; Nemerson, Y. (1975): Association of tissue factor activity with the surface of cultured cells. In: *J. Clin. Invest.* 55 (4), S. 814–824.

Mohren, M.; Markmann, I.; Jentsch-Ullrich, K.; Koenigsmann, M.; Lutze, G.; Franke, A. (2006): Increased risk of venous thromboembolism in patients with acute leukaemia. In: *Br. J. Cancer* 94 (2), S. 200–202.

Morrissey, James H.; Tajkhorshid, Emad; Sligar, Stephen G.; Rienstra, Chad M. (2012): Tissue factor/factor VIIa complex: role of the membrane surface. In: *Thromb. Res.* 129 Suppl 2, S. S8-10.

Munro, S.; Pelham, H. R. (1987): A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. In: *Cell* 48 (5), S. 899–907.

Nadir, Yona; Katz, Tamar; Sarig, Galit; Hoffman, Ron; Oliven, Anna; Rowe, Jacob M.; Brenner, Benjamin (2005): Hemostatic balance on the surface of leukemic cells: the role of tissue factor and urokinase plasminogen activator receptor. In: *Haematologica* 90 (11), S. 1549–1556.

Nemerson, Y. (1988): Tissue factor and hemostasis. In: *Blood* 71 (1), S. 1–8.

- O'Neill, S.; Robinson, A.; Deering, A.; Ryan, M.; Fitzgerald, D. J.; Moran, N. (2000): The platelet integrin alpha IIb beta 3 has an endogenous thiol isomerase activity. In: *J. Biol. Chem.* 275 (47), S. 36984–36990.
- Olthof, Margreet R.; Hollman, Peter C. H.; Buijsman, Michel N. C. P.; van Amelsvoort, Johan M. M.; Katan, Martijn B. (2003): Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. In: *J. Nutr.* 133 (6), S. 1806–1814.
- Osterud, B.; Flaegstad, T. (1983): Increased tissue thromboplastin activity in monocytes of patients with meningococcal infection: related to an unfavourable prognosis. In: *Thromb. Haemost.* 49 (1), S. 5–7.
- Osterud, B.; Rao, L. V.; Olsen, J. O. (2000): Induction of tissue factor expression in whole blood: lack of evidence for the presence of tissue factor expression in granulocytes. In: *Thromb. Haemost.* 83 (6), S. 861–867.
- Østerud, Bjarne; Bjørklid, Eirik (2006): Sources of tissue factor. In: *Semin. Thromb. Hemost.* 32 (1), S. 11–23.
- Owens, A. Phillip; Mackman, Nigel (2011): Microparticles in hemostasis and thrombosis. In: *Circ. Res.* 108 (10), S. 1284–1297.
- Payán-Gómez, Sergio A.; Flores-Holguín, Norma; Pérez-Hernández, Antonino; Piñón-Miramontes, Manuel; Glossman-Mitnik, Daniel (2010): Computational molecular characterization of the flavonoid rutin. In: *Chem Cent J* 4, S. 12.
- Pendurthi, Usha R.; Ghosh, Samit; Mandal, Samir K.; Rao, L. Vijaya Mohan (2007): Tissue factor activation: is disulfide bond switching a regulatory mechanism? In: *Blood* 110 (12), S. 3900–3908.
- Pirneskoski, Annamari; Klappa, Peter; Lobell, Mario; Williamson, Richard A.; Byrne, Lee; Alanen, Heli I. et al. (2004): Molecular characterization of the principal substrate binding site of the ubiquitous folding catalyst protein disulfide isomerase. In: *J. Biol. Chem.* 279 (11), S. 10374–10381.
- Pitlick, F. A. (1975): Concanavalin A inhibits tissue factor coagulant activity. In: *J. Clin. Invest.* 55 (1), S. 175–179.
- Popescu, N. I.; Lupu, C.; Lupu, F. (2010): Extracellular protein disulfide isomerase regulates coagulation on endothelial cells through modulation of phosphatidylserine exposure. In: *Blood* 116 (6), S. 993–1001.
- Quan, H.; Fan, G.; Wang, C. C. (1995): Independence of the chaperone activity of protein disulfide isomerase from its thioredoxin-like active site. In: *J. Biol. Chem.* 270 (29), S. 17078–17080.
- Rak, Janusz; Yu, Joanne L.; Luyendyk, James; Mackman, Nigel (2006): Oncogenes, trousseau syndrome, and cancer-related changes in the coagulome of mice and humans. In: *Cancer Res.* 66 (22), S. 10643–10646.
- Rana, S. V.; Reimers, H. J.; Pathikonda, M. S.; Bajaj, S. P. (1988): Expression of tissue factor and factor VIIa/tissue factor inhibitor activity in endotoxin or phorbol ester stimulated U937 monocyte-like cells. In: *Blood* 71 (1), S. 259–262.
- Rao, L. Vijaya Mohan; Kothari, Hema; Pendurthi, Usha R. (2012): Tissue factor: mechanisms of decryption. In: *Front Biosci (Elite Ed)* 4, S. 1513–1527.
- Rapaport, S. I.; Rao, L. V. (1995): The tissue factor pathway: how it has become a "prima ballerina". In: *Thromb. Haemost.* 74 (1), S. 7–17.

- Raturi, Arun; Miersch, Shane; Hudson, John W.; Mutus, Bulent (2008): Platelet microparticle-associated protein disulfide isomerase promotes platelet aggregation and inactivates insulin. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (12), S. 2790–2796.
- Rehemtulla, A.; Ruf, W.; Edgington, T. S. (1991): The integrity of the cysteine 186-cysteine 209 bond of the second disulfide loop of tissue factor is required for binding of factor VII. In: *J. Biol. Chem.* 266 (16), S. 10294–10299.
- Reinhardt, C. (2007): New locations of intravascular tissue factor: indications. In: *Hamostaseologie* 27 (1), S. 55–58.
- Reinhardt, Christoph; Brühl, Marie-Luise von; Manukyan, Davit; Grahl, Lenka; Lorenz, Michael; Altmann, Berid et al. (2008): Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. In: *J. Clin. Invest.* 118 (3), S. 1110–1122.
- Rivers, R. P. A.; Hathaway, W. E.; Weston, W. L. (1975): The Endotoxin-induced Coagulant Activity of Human Monocytes. In: *Br J Haematol* 30 (3), S. 311–316.
- Roth, R. A. (1981): Bacitracin: an inhibitor of the insulin degrading activity of glutathione-insulin transhydrogenase. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98 (2), S. 431–438.
- Ruf, A.; Pick, M.; Deutsch, V.; Patscheke, H.; Goldfarb, A.; Rachmilewitz, E. A. et al. (1997): In-vivo platelet activation correlates with red cell anionic phospholipid exposure in patients with beta-thalassaemia major. In: *Br. J. Haematol.* 98 (1), S. 51–56.
- Ruf, W.; Edgington, T. S. (1994): Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo. In: *FASEB J.* 8 (6), S. 385–390.
- Ryser HJ, Levy EM, Mandel R, DiSciullo GJ (1994): Inhibition of human immunodeficiency virus infection by agents that interfere with thiol-disulfide interchange upon virus-receptor interaction. In: *Journal of Biological Chemistry*, 91(10):4559–4563.
- Samad, F.; Pandey, M.; Loskutoff, D. J. (2001): Regulation of tissue factor gene expression in obesity. In: *Blood* 98 (12), S. 3353–3358.
- Schechter, A. D.; Giesen, P. L.; Taby, O.; Rosenfield, C. L.; Rossikhina, M.; Fyfe, B. S. et al. (1997): Tissue factor expression in human arterial smooth muscle cells. TF is present in three cellular pools after growth factor stimulation. In: *J. Clin. Invest.* 100 (9), S. 2276–2285.
- Stefano, V. de; Sorà, F.; Rossi, E.; Chiusolo, P.; Laurenti, L.; Fianchi, L. et al. (2005): The risk of thrombosis in patients with acute leukemia: occurrence of thrombosis at diagnosis and during treatment. In: *J. Thromb. Haemost.* 3 (9), S. 1985–1992.
- Stone, K. J.; Strominger, J. L. (1971): Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C 55 -isoprenyl pyrophosphate. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68 (12), S. 3223–3227.
- Täger, M.; Kröning, H.; Thiel, U.; Ansorge, S. (1997): Membrane-bound protein disulfide isomerase (PDI) is involved in regulation of surface expression of thiols and drug sensitivity of B-CLL cells. In: *Exp. Hematol.* 25 (7), S. 601–607.
- Tanaka, M.; Yamanishi, H. (1993): The expression of tissue factor antigen and activity on the surface of leukemic cells. In: *Leuk. Res.* 17 (2), S. 103–111.
- Terada, K.; Manchikalapudi, P.; Noiva, R.; Jauregui, H. O.; Stockert, R. J.; Schilsky, M. L. (1995): Secretion, surface localization, turnover, and steady state expression of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes. In: *J. Biol. Chem.* 270 (35), S. 20410–20416.

- Tsuchiya, S.; Yamabe, M.; Yamaguchi, Y.; Kobayashi, Y.; Konno, T.; Tada, K. (1980): Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). In: *Int. J. Cancer* 26 (2), S. 171–176.
- Turano, Carlo; Coppari, Sabina; Altieri, Fabio; Ferraro, Anna (2002): Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. In: *J. Cell. Physiol.* 193 (2), S. 154–163.
- Ueno, T.; Toi, M.; Koike, M.; Nakamura, S.; Tominaga, T. (2000): Tissue factor expression in breast cancer tissues: its correlation with prognosis and plasma concentration. In: *Br. J. Cancer* 83 (2), S. 164–170.
- Uno, K.; Homma, S.; Satoh, T.; Nakanishi, K.; Abe, D.; Matsumoto, K. et al. (2007): Tissue factor expression as a possible determinant of thromboembolism in ovarian cancer. In: *Br. J. Cancer* 96 (2), S. 290–295.
- Utsugi, T.; Schroit, A. J.; Connor, J.; Bucana, C. D.; Fidler, I. J. (1991): Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. In: *Cancer Res.* 51 (11), S. 3062–3066.
- van Dam-Mieras, M. C.; Bruggeman, C. A.; Muller, A. D.; Debie, W. H.; Zwaal, R. F. (1987): Induction of endothelial cell procoagulant activity by cytomegalovirus infection. In: *Thromb. Res.* 47 (1), S. 69–75.
- Versteeg, Henri H.; Ruf, Wolfram (2007): Tissue factor coagulant function is enhanced by protein-disulfide isomerase independent of oxidoreductase activity. In: *J. Biol. Chem.* 282 (35), S. 25416–25424.
- Versteeg, Henri H.; Spek, C. Arnold; Peppelenbosch, Maikel P.; Richel, Dick J. (2004): Tissue factor and cancer metastasis: the role of intracellular and extracellular signaling pathways. In: *Mol. Med.* 10 (1-6), S. 6–11.
- Wallis, Anne Katrine; Sidhu, Ateesh; Byrne, Lee J.; Howard, Mark J.; Ruddock, Lloyd W.; Williamson, Richard A.; Freedman, Robert B. (2009): The ligand-binding b' domain of human protein disulphide-isomerase mediates homodimerization. In: *Protein Sci.* 18 (12), S. 2569–2577.
- Wan, Shu-Wen; Lin, Chiou-Feng; Lu, Yi-Tien; Lei, Huan-Yao; Anderson, Robert; Lin, Yee-Shin (2012): Endothelial cell surface expression of protein disulfide isomerase activates β 1 and β 3 integrins and facilitates dengue virus infection. In: *J. Cell. Biochem.* 113 (5), S. 1681–1691.
- Wang, C. C.; Tsou, C. L. (1993): Protein disulfide isomerase is both an enzyme and a chaperone. In: *FASEB J.* 7 (15), S. 1515–1517.
- Webert, Kathryn; Cook, Richard J.; Sigouin, Chris S.; Rebutta, Paolo; Heddle, Nancy M. (2006): The risk of bleeding in thrombocytopenic patients with acute myeloid leukemia. In: *Haematologica* 91 (11), S. 1530–1537.
- Wolberg, A. S.; Monroe, D. M.; Roberts, H. R.; Hoffman, M. R. (1999): Tissue factor de-encryption: ionophore treatment induces changes in tissue factor activity by phosphatidylserine-dependent and -independent mechanisms. In: *Blood Coagul. Fibrinolysis* 10 (4), S. 201–210.
- Yoshimori, T.; Semba, T.; Takemoto, H.; Akagi, S.; Yamamoto, A.; Tashiro, Y. (1990): Protein disulfide-isomerase in rat exocrine pancreatic cells is exported from the endoplasmic reticulum despite possessing the retention signal. In: *J. Biol. Chem.* 265 (26), S. 15984–15990.

Zhou, Ji; May, Linda; Liao, Peng; Gross, Peter L.; Weitz, Jeffrey I. (2009): Inferior vena cava ligation rapidly induces tissue factor expression and venous thrombosis in rats. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29 (6), S. 863–869.

Zillmann, A.; Luther, T.; Müller, I.; Kotzsch, M.; Spannagl, M.; Kauke, T. et al. (2001): Platelet-associated tissue factor contributes to the collagen-triggered activation of blood coagulation. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281 (2), S. 603–609.

Zwaal, R. F. A.; Comfurius, P.; Bevers, E. M. (2005): Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 62 (9), S. 971–988.7

8. Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie zwei Personen:

meinem Doktorvater Herrn Dr. med. Florian Langer, der für diese Doktorarbeit die inhaltlichen und materiellen Voraussetzungen geschaffen hat und viel Zeit geopfert hat, mir beim Finden und Beibehalten des roten Fadens zu helfen. Vielen Dank für die großartige Betreuung, das engagierte Korrekturlesen und das stets offene Ohr für die geringfügigsten Anliegen.

Ich danke zudem Brigitte Spath für die geduldige Einarbeitung, tatkräftige Unterstützung sowie ausgezeichnete Unterhaltung im Labor. Ohne sie hätte die Arbeit nicht halb so viel Spaß gemacht.

Dr. Felix Richter und Anna Fischer waren mir durch aufmerksames Lesen mit kritischen Anmerkungen eine große Hilfe.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Maria Cornelia Fischer
Anschrift: Rehmstraße 20
22299 Hamburg
Geburtsdatum: 24.03.1987
Geburtsort: Baden-Baden
Eltern: Matthias Fischer
Silvia Fischer geb. Richter

Schulbildung:

1993- 97 Theodor-Heuss-Schule Baden-Baden
1997- 2006 Kolleg St. Sebastian Stegen
Abschluss: Abitur (1,4)

Studium:

Oktober 2007 Beginn des Medizinstudiums an der Universität Hamburg
August 2009 1. Staatsexamen (1,5)
2010/2011 Studienaufenthalt an der Medizinischen Universität Warschau
Februar 2013 Beginn des Praktischen Jahrs
April 2014 2. Staatsexamen

Praktische Ausbildung:

Famulaturen: August 2010 Innere Medizin (Bethel Krankenhaus, Berlin)
Februar 2011 Allgemein Chirurgie (Universitätsklinikum Warschau)
August 2011 Anästhesie (Universitätsklinikum Freiburg)
Januar 2012 Allgemeinmedizin (Praxis Dr. Peter Burchardt, Hamburg)
Praktisches Jahr: 1. Terial Neurologie (Universitätsklinikum Eppendorf)
2. Terial Innere Medizin (Universitätsspital Basel)
3. Terial Chirurgie (Marienkrankenhaus, Hamburg)

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: