

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin B (Kardiologie)  
(Direktor Univ.- Prof. Dr. med. Stephan Felix)  
der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Thema: Untersuchungen zur Angiotensin II -vermittelten Tissue Factor -Induktion an einem  
In vitro Monozytenmodell

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin  
(Dr. med.)

der

Medizinischen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2003

vorgelegt von:  
Lothar Albrecht:  
geb. am: 14.04.1969  
in: Hofgeismar

Dekan: Prof. Dr. rer. Nat. H. K. Kroemer

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Stephan Felix

2. Gutachter: PD Dr. med. Hans Hölschermann, Justus Liebig Universität Gießen

Ort, Raum: Klinik für Innere Medizin (Loefflerstr 23, Greifswald), Seminarraum 3. OG

Tag der Disputation: 18.02.2004

*Meinen Eltern und Lehrern  
in Dankbarkeit*

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1 Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1 Klinischer Hintergrund der Untersuchung	
1.2 Ziele der Arbeit	4
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>5</b>
2.1 Monozytenisolierung	
2.1.1 Vitalitätsprüfung	8
2.1.2 Zellkultur	9
2.1.3 Versuchsanordnung	
2.2 Prokoagulatorische Aktivität	10
2.3 Tissue-Factor Assay	13
2.4 RNA-Isolierung und Reverse-Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	16
2.4.1 RNA-Isolierung mit dem Roti™-Quick-Kit	
2.4.2 Gesamt-RNA-Bestimmung	17
2.4.3 Herstellung einer einsträngigen komplementären DNA [cDNA] mittels RT-PCR	
2.4.4 Durchführung der PCR	18
2.4.5 Gelelektrophorese	20
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>21</b>
3.1 Prokoagulatorische Aktivität (PCA)	
3.2 Tissue Factor Assay [TF-A]	24
3.3 Semiquantitative PCR [sPCR]	26
3.4 Angiotensin II – Rezeptor – PCR	31
3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse	32

<b>4 Diskussion</b>	<b>34</b>
<b>4.1 Bisherige Untersuchungen zum Zusammenhang von Tissue         Factor und Angiotensin II</b>	<b>39</b>
<b>4.2 Bewertung der Befunde</b>	<b>44</b>
<b>4.3 Einfluss der monozytären Differenzierung auf deren Tissue         Factor – Expression</b>	<b>45</b>
<b>4.4 Angiotensin II – Tissue Factor – Response: Ausdruck zellulärer         Spezialisierung?</b>	<b>48</b>
<b>4.5 Angiotensin II – Rezeptor und Signaltransduktion</b>	<b>50</b>
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>54</b>
<b>6 Schlusswort und Ausblicke</b>	<b>56</b>
<b>I Literaturverzeichnis</b>	<b>59</b>
<b>II Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>75</b>
<b>III Anhang</b>	<b>77</b>
<b>III.1 Ein- und Ausschlusskriterien für eine Blutspende</b>	
<b>III.2 Materialverzeichnis</b>	<b>79</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>86</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>87</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Klinischer Hintergrund der Untersuchung

Tissue Factor [TF] ist ein gerinnungsaktives Protein, das über den extrinsischen Pfad die Gerinnungskaskade aktiviert und eine Thrombinbildung induziert [1]. Tissue Factor konnte in arteriosklerotisch veränderten Gefäßwänden von Herzinfarktpatienten vermehrt nachgewiesen werden [2]. Bei diesem Patientenkollektiv findet sich darüber hinaus auch eine verstärkte Gerinnungsneigung, die ursächlich auf Tissue Factor zurückgeführt wird [3].

Unter physiologischen Bedingungen wird Tissue Factor nur von Zellen exprimiert, die keinen direkten Kontakt zu zellulären und plasmatischen Blutbestandteilen haben. Endothelzellen, Monozyten/Makrophagen und glatte Gefäßmuskelzellen bilden dieses Protein nur unter Einwirkung von stimulierenden Substanzen, wie z.B. Lipopolysaccharid (LPS) [4, 5, 6]. Damit wird eine ungerichtete vaskuläre Gerinnungsaktivierung verhindert.

Unter pathologischen Bedingungen wie dem akuten Herzinfarkt wird bei der Ruptur eines arteriosklerotischen Plaques thrombogenes Material freigesetzt [7,8]. Da es neben Plaques mit Tissue Factor auch andere, nicht thrombogene Plaques gibt, wird er als ein prognostischer Faktor für deren Thrombogenität eingestuft [9]. Die Herkunft des vaskulären Tissue Factors ist nicht gänzlich geklärt, jedoch weisen eine Reihe von Befunden darauf hin, dass er von Monozyten und deren Derivatzellen synthetisiert und sezerniert wird [10]. Monozyten in arteriosklerotischen Plaques weisen selbst große Mengen membrangebundenen Tissue Factors auf. In ihrer unmittelbaren Nähe finden sich große Mengen freien Tissue Factors, so dass von einer monozytären Tissue Factor – Bildung ausgegangen wird [11].

Die Induktion der monozytären Tissue Factor – Bildung im koronaren Plaque ist wahrscheinlich multifaktoriell bedingt. Die Tatsache, dass eine Senkung der Reinfarktrate unter einer zweiwöchigen Angiotensin – Converting Enzym (ACE) – Hemmer – Therapie mit einer Senkung der Tissue Factor – Menge einhergeht, legt die Vermutung nahe, dass vaskuläre Renin – Angiotensin – Systeme (RAS ) für die Arteriosklerose und die Plaqueruptur eine wesentliche Rolle spielen [12]. Die Effektivität der ACE – Hemmer auf den Verlauf und die Rezidivrate des akuten Myokardinfarktes sind hinlänglich bekannt. Neben einer günstigen Beeinflussung der Herzinsuffizienz wirken sie auch auf die Häufigkeit von Rethrombosen positiv [13]. Sowohl die Senkung der Tissue Factor –Konzentration in der arteriosklerotischen Läsionen [14] – ursächlich durch Monozyten/Makrophagen verursacht [15] – als auch eine Senkung der gesteigerten systemischen Tissue Factor - Aktivität konnten belegt werden [16].

Der nachgewiesene Zusammenhang zwischen einer Mutation des ACE – Genes und einem erhöhten Herzinfarkttrisiko ist ein weiterer Beleg für die Bedeutung des Renin – Angiotensin – Systems für die koronare Herzkrankheit [17].

## **1.2 Ziele der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Frage zu beantworten, ob Angiotensin II an Monozyten in einem In – vitro – Modell eine signifikante Steigerung der Tissue Factor – Synthese induziert und ob ein solcher Effekt mit einem selektiven Angiotensin II – Rezeptorantagonisten gehemmt werden kann.

## **2 Material und Methoden**

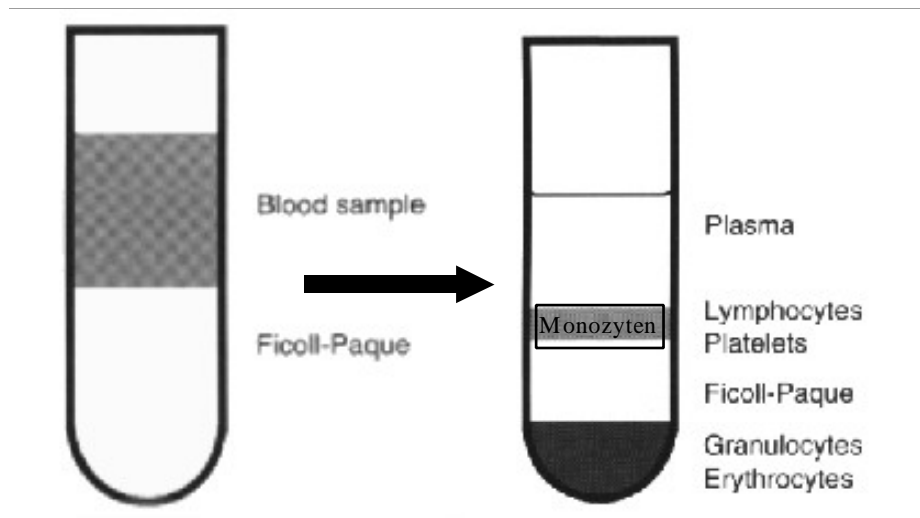
### **2.1 Monozytenisolierung**

Menschliche, periphere mononukleäre Blutzellen (MO) wurden aus Buffy Coats gesunder Blutspender über eine Ficoll™ - Hypaque – Dichtegradientenzentrifugation [18] und Adhärenz an mit Gelatine und Fibronectin beschichtete Zellkulturflaschen [19] isoliert.

Um eine Vergleichbarkeit der Versuchsansätze zu gewährleisten und patientenspezifische Einflüsse auszuschalten, wurden jeweils Buffy Coats von 6 Spendern für die Monozytenisolierung gemischt.

Die Buffy Coats werden mit Hanks balanced Salts ohne Calcium, Magnesium und Phenolrot [HBSS] (Firma PAA™, Linz, Österreich) im Verhältnis 1:1 gemischt, von dieser Mischung wird die Hälfte in 50 ml Polypropylen-Zentrifugenröhrchen [Zentrifugenröhrchen] (Becton Dickinson/Falcon™, New Jersey, SA, USA) auf 25 ml Ficoll-Paque™ Research Grade (Amersham Pharmacia Biotech AB™, Upsalla, Schweden) geschichtet. Bei 1700 rpm und 15°C werden die Zellfraktionen 30 min lang in einer Zentrifuge ohne Bremse (Megafuge 2.0 R, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) über einen Dichtegradienten getrennt.

**Abbildung 1: Ficoll- Paque™- Dichtegradientenzentrifugation**



nach: Ficoll- Paque™- Research Grade Instructions, Pharmacia Biotech.

Die mononukleäre Zellfraktion aus Lymphozyten und Monozyten wird in Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit HBSS aufgefüllt, alle anderen Zellfraktionen werden verworfen. Die mononukleären Zellen werden durch eine weitere Zentrifugation bei 1100 rpm mit Bremse (10 min lang bei 15 °C), erneutes Abpipettieren des Überstandes, Lösen des Zellpellets und Resuspensionierung mit HBSS dreimal von Ficollresten gereinigt.

Das Zellpellet wird gelöst und in Makrophagen serumfreiem Medium ohne Calcium 1x [M-SFM] (Gibco BRL™, Eggenstein, Deutschland) suspendiert.

Ca. 10 ml der Suspension aus mononukleären Zellen und Makrophagen – serumfreien – Medium werden auf eine serumbeschichtete Gelatineplatte aufgetragen und 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Die Gelatineplatten werden einen Tag vor dem Isoliervorgang vorbereitet. Gelatine Type A from Porcine Skin (Sigma – Aldrich™, Steinheim, Deutschland) wird in warmem Aqua dest. zu einer 1% Lösung (mg/ml) gelöst und mittels bakteriendichten Filter (Millex – GS – Filter, Non – Pyrogenic, steril, 0,22 µm Millipore, Molsheim, Frankreich) auf 250 ml Gewebekulturflaschen (Greiner™, Frickenhausen,

Deutschland) gleichmäßig verteilt. Ein Gelatinefilm verbleibt auf dem Boden der Kulturflaschen, die nach Abpipettieren der überflüssigen Gelatine 12 Stunden lang bei 50° C in einem Ofen getrocknet werden.

Am Tag der Monozytenisolierung werden Teile derselben Buffy Coats, die für die Monozytenisolierung verwendet werden, bei 3000 rpm und 10°C 10 min lang zweimal zentrifugiert, um zellfreies Serum zu gewinnen. Davon werden 10 ml auf die gelatinebeschichteten Zellkulturflaschen gegeben und 30 min im Brutschrank inkubiert. Im Serum vorhandenes Fibronectin bindet dabei an die Gelatineschicht. Der Überstand wird abpipettiert. Durch dreimaliges Waschen mit HBSS werden im Serum verbliebene Zelltrümmer und Zellen entfernt.

Die spezifische Bindung der Monozyten an Fibronectin [19] wird mittels 10 ml eines Gemisches aus 7 ml Dulbecco's Phosphate buffered Salts ohne Calcium, Magnesium und Phenolrot [PBS] (PAA™, Linz, Österreich) und 3 ml Seromed EDTA Versen 1% in PBS ohne Calcium, Magnesium [EDTA] (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) 10 min lang bei 10°C gelöst und die entstandene Zellsuspension in einem Zentrifugenröhrchen bei 1100 rpm mit Bremse für weitere 10 min bei 15 °C zentrifugiert. Das Monozytenpellet wird mechanisch auf einem Vortexgerät gelöst und mit Makrophagen – serumfreien – Medium aufgefüllt.

#### Berechnung der Zellzahl

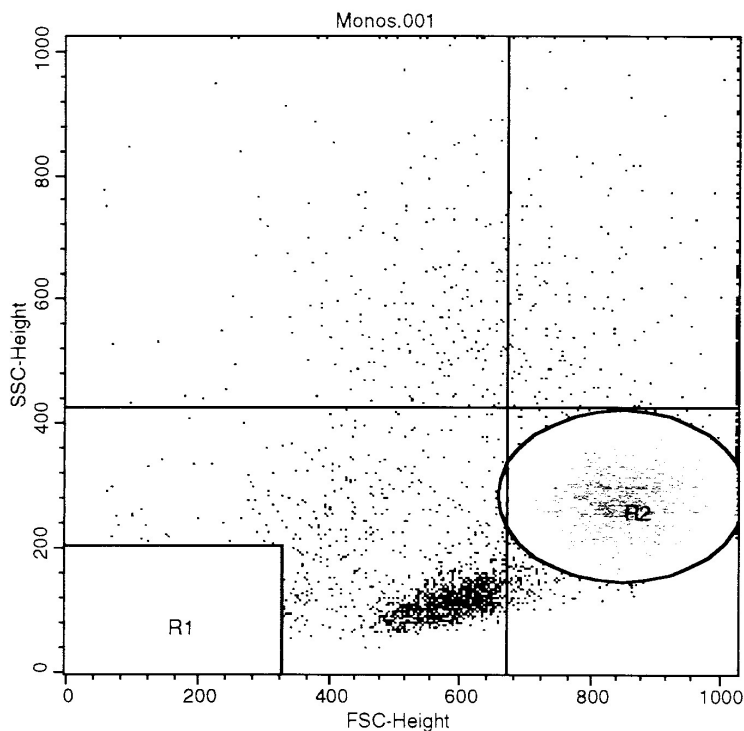
50 µl der Monozytensuspension werden mit 50 µl Trypanblau verdünnt, davon werden 50 µl in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Mittels einer Formel (Zählergebnis x 2 x 10.000/ ml) errechnet man die Gesamtzahl der Monozyten und verdünnt dann mit M – SFM auf eine beliebige Konzentration, z.B.  $1 \times 10^6$  Monozyten/

ml Trypanblau färbt nur Zellen an, deren Zellmembranintegrität zerstört ist, d.h. letale Zellen.

### 2.1.1 Vitalitätsprüfung

Die Vitalität der Zellen liegt über 95% und wird durch Ethidiumbromidfärbung, eine DNS – Färbung, auf einem Objektträger und Mikroskopie und Fluoreszenz – aktivierte – Zellseparierende – Analyse (FACS) mit einem FACS – Scan – Analysegerät (Becton Dickinson, New Jersey, USA) ermittelt. Durch eine Pappenheimfärbung [20] auf Objektträgern und eine unspezifische Esterasenfärbung nach Löffler [21] sowie FACS – Analyse [22] konnte eine Reinheit der isolierten Monozyten von etwa 90 % dokumentiert werden.

**Abbildung 2: FACS-Analyse**



**Isolierungsergebnis( Monozyten eingekreiste Punkte) nach Streuung und Zellgröße (x,y-Achse)**

### **2.1.2 Zellkultur**

Eine serumbedingte Tissue Factor – Induktion wurde durch Verwendung eines serumfreien Medium ausgeschlossen, da Serum eine Tissue Factor – Synthese induzieren kann [24].

Die Monozytensuspension werden in entsprechender Konzentration auf Zellkulturplatten verteilt (1 Mio. / 1ml MSFM für die Messung der prokoagulatorischen Aktivität, 50.000 / 200µl MSFM für die Messung des Tissue Factor Assays und 3 Mio / 3ml MSFM für die Bestimmung der Polymerase-Kettenreaktion) und 24 Stunden lang in einem Brutschrank (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) bei 37 °C und 5% Kohlendioxidsättigung inkubiert. Nach einem Mediumwechsel, bei dem alle Zellen einmal mit HBSS gewaschen werden, bevor erneut Medium aufgetragen wird, und einer weiteren Inkubation für 2 Stunden im Brutschrank erfolgt die Versuchsdurchführung.

### **2.1.3 Versuchsanordnung**

Monozyten werden in verschiedenen Zeitfenstern mit synthetischem, humanem Angiotensin II (A9525, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) stimuliert. Serum- oder gerinnungsbedingte Aktivierung der Zellen wird durch Kultivierung in calcium- und serumfreien Medium vermieden. Als Negativkontrolle dienen unstimulierte Monozytenkulturen, als Positivkontrollen solche, die mit Lipopolysaccharid (LPS) (Escherichia coli 0111:B4; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) stimuliert wurden. LPS induziert eine starke Tissue Factor – Expression bei Monozyten [24]. Nach Ermittlung von optimaler Konzentration und Dauer der Angiotensin II – Stimulation wird den Versuchsansätzen Losartan (DuP753, MSD Sharp & Dohme, Haar, Deutschland) in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Die Reinsubstanzen

(LPS, Angiotensin II und Losartan) wurden zuvor in reinem Kulturmedium (M – SFM) auf verschiedene Konzentrationen verdünnt.

**Tabelle 1: Chemische Eigenschaften von Angiotensin II und Losartan**

2.1.3.1 Verbindungsname	Angiotensin II	Losartan
<b>Chemischer Name</b>	ASP-ARG-VAL-TYR-ILE-HIS-PRO-PHE	2-n-butyl-4-chloro-5-hydroxymethyl-1-[(2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl)methyl]imidazol, Kaliumsalz
<b>Chemische Formel</b>	C <sub>50</sub> H <sub>71</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>6</sub> OK
<b>Molekulargewicht</b>	1046,2	461,01
<b>Schmelzpunkt</b>		267°C-269°C
<b>Erscheinungsform</b>	Weiß, kristallin, fest	Weiß, kristallin, fest
<b>Löslichkeit</b>	Bis zu 5 mg auf 0,2 ml Wasser	Wasserlöslich (bis zu 100 mg/ml), löslich in Dimethylsulfoxid und Methanol, unlöslich in Säuren
<b>Stabilität</b>	Bei -20°C unbegrenzt	Bei 4°C, wenn vor Licht geschützt
<b>Bindungsaffinität zu Angiotensin II- Rezeptoren IC<sub>50</sub></b>		1,9 x 10 <sup>-8</sup> M (Rattennebenieren)
<b>Aktive Metaboliten</b>	z.B. Angiotensin IV	EXP3174

Bestimmt wurden die prokoagulatorische Aktivität, ein Tissue Factor – Assay und eine Tissue Factor – spezifische Polymerase – Kettenreaktion. Der Nachweis des Angiotensin II – Rezeptorsubtyps 1 (AT<sub>1</sub>, Losartan – spezifisch) wurde mittels einer spezifischen Polymerase – Kettenreaktion nur qualitativ durchgeführt.

## 2.2 Prokoagulatorische Aktivität

In Gewebekulturplatten (Makroplatten Cellstar™ 6 Loch steril, Greiner™, Frickenhausen, Deutschland) werden 1 Mio. Monozyten / 1ml M-SFM inkubiert. Zunächst wird die Wirkung von Angiotensin II nach 0-, 4-, 6-, 8-, 12-, und 24-

stündiger Inkubation in einem Konzentrationsbereich von  $10^{-4}$  bis  $10^{-10}$  mg Ang II/ $10^6$  Monozyten bestimmt. Nach statistischer Beratung durch ein Institut für medizinische Informatik wird jeder Versuchsansatz als Dreifachbestimmung durchgeführt und der Median zur statistischen Auswertung herangezogen, da er der gegen „Ausreißer“ inerteste Parameter ist. Die Auswertung erfolgt mittels eines Wilcoxon – Tests.

Die Versuche werden durch Einfrieren der Zellkulturen bei  $-80^{\circ}$  C beendet. Durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen werden die Monozyten lysiert, membrangebundener Tissue Factor wird freigesetzt. Die entstanden Zelltrümmer werden mechanisch von den Gewebekulturplatten gelöst, auf einem Vortexgerät homogenisiert und in Eppendorf – Hütchen aliquotiert.

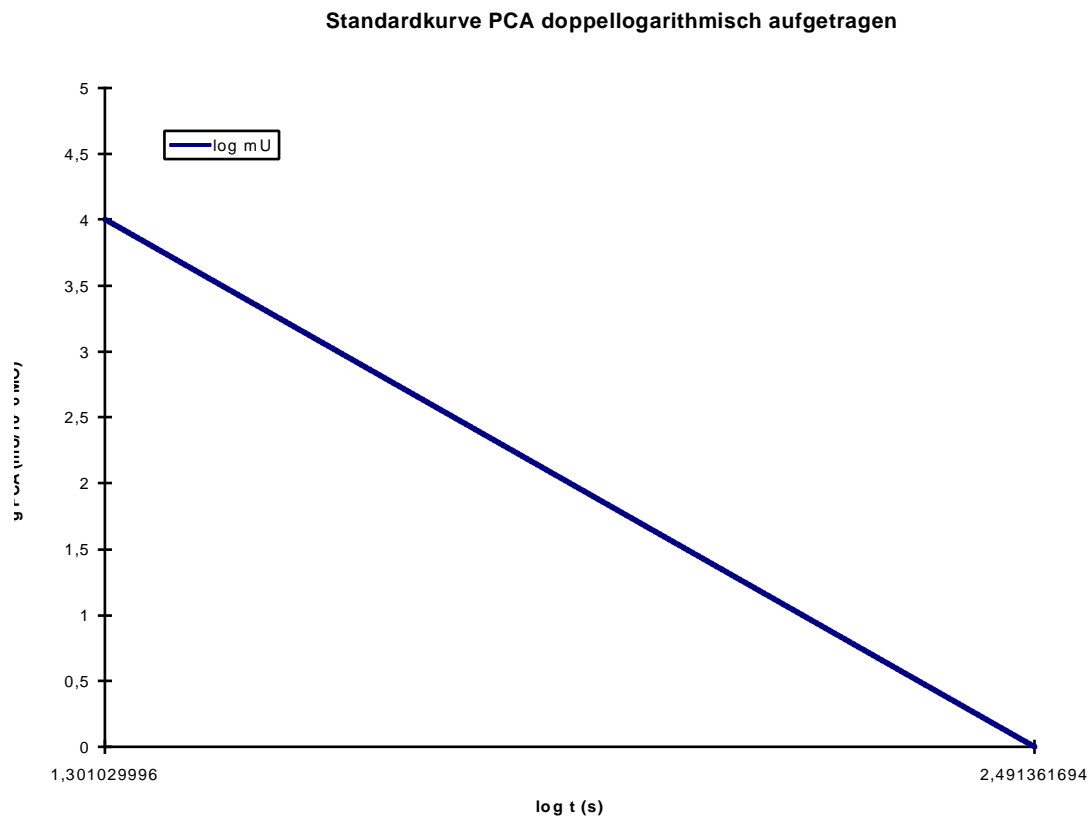
Die prokoagulatorischen Aktivität (PCA) der lysierten Monozyten wird in einem einstufigen Gerinnungsversuch nach Helin und Edgington (1983) [25] bestimmt, bei dem die Zeit bis zur Gerinnung einer 1:1-Mischung aus lysierten Monozyten und plättchenarmen humanem Citratplasma (Standardhumanplasma, Dade Behring, Marburg, Deutschland) gestoppt wird.

Nach Mischen werden 50  $\mu$ l einer homogenisierten Monozytenprobe zusammen mit 50  $\mu$ l calciumfreien Standardhumanplasma 3 min lang in einem im Wasserbad bei  $37^{\circ}$ C erwärmt. Durch Zugabe von 50  $\mu$ l 25mM Calciumchlorid (Behringwerke™, Marburg, Deutschland) wird die Tissue Factor – spezifische Gerinnungskaskade gestartet und die Zeit bis zum Auftreten eines Fibrinkoagels unter Umrühren mit einem Spatel durch Beobachtung gemessen.

Die ermittelten Gerinnungszeiten wurden mittels einer Standardkurve in PCA – Milliunits pro  $10^6$  Zellen umgerechnet. Diese Standardkurve (doppelt – logarithmische Aufteilung) wurde anhand einer standardisierten Verdünnungsreihe einer Kaninchenhirn – Thromboplastinaufbereitung (Sigma) ermittelt und ist zwischen 1 mU (310 Sekunden) und 10.000 mU (20 Sekunden) linear. Alle Werte wurden in

mU/10<sup>6</sup> Zellen angegeben. Proben mit Medium alleine und Medium mit Reagenzien (Standardhumanplasma und Calciumchlorid) zeigten keine PCA.

**Abbildung 3: Standardkurve der PCA**



Alle benutzten Medien und Puffer werden auf Kontamination durch Endotoxin mit einem Standard Limulus Amoebocyt – Test und der dabei typischen Farbreaktion [26] qualitativ überprüft. Dabei kann ein Endotoxingehalt von weniger als 12,5 pg/ml auf der unteren Nachweisgrenze des Testes ermittelt werden.

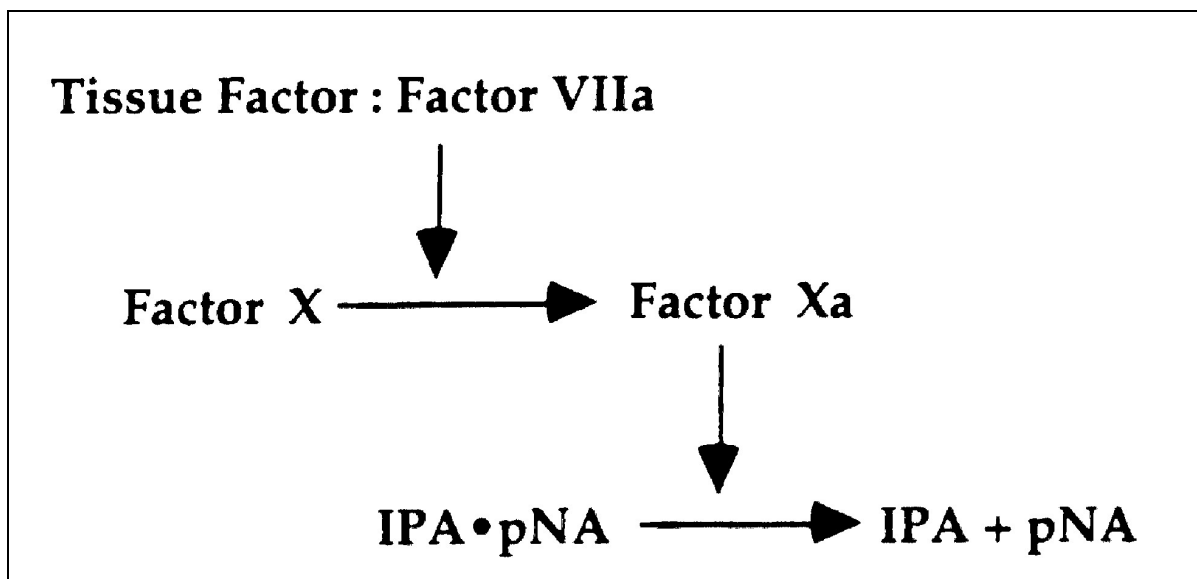
Factor – VII – Mangelplasma und monospezifische Antikörper gegen menschlichen Tissue Factor (American Diagnostica Inc, Greenwich, CT) charakterisierten PCA als Tissue – Factor bedingte Reaktion. Diese Untersuchungen wurden bereits bei der Etablierung der Verfahren im Labor validiert [20].

### 2.3 Tissue – Factor Assay

Um die Tissue Factor – Aktivität quantifizieren zu können, wird ein chromogenes Tissue Factor – Assay das die Faktor Xa – Aktivierung [27] misst, entwickelt und für die eigenen Bedingungen modifiziert.

Nach Komplexbildung von Tissue Factor und Faktor VII wird Faktor X zu Xa aktiviert. Die Menge an Faktor Xa ist der Tissue Factor – Aktivität der Probe direkt proportional. Faktor Xa setzt den Farbstoff p-Nitroanilide (pNA) aus dem chromogenen Substrat frei. Der Farbstoff hat eine spezifische Lichtabsorption bei 405 nm, die photometrisch bestimmt werden kann.

**Abbildung 4: Prinzip des chromogenen Tissue Factor spezifischen prokoagulatorischen Aktivitätsassays.**



Die Menge an aktiviertem Faktor X ist der Tissue Factor – Aktivität der Probe proportional. Modifiziert nach [27].

Zur Messung des chromogenen Tissue Factor – Assays wurden Zellkulturen mit 50.000 Monozyten / 200µl MSFM in 96 – Loch – Mikrotiterplatten (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) kultiviert und stimuliert. Je Versuchsansatz werden

zwei Proben bestimmt und der Mittelwert statistisch mittels Wilcoxon – Analyse ausgewertet.

Zur Beendigung der Versuche wird das Medium abpipettiert und die Zellen auf den Platten zweimal mit Pufferlösung gewaschen und dann bei  $-80^{\circ}\text{C}$  trocken eingefroren.

Bei Entnahme der Mikrotiterplatten aus dem Gefrierschrank lysieren die Monozyten und setzen membrangebunden Tissue Factor frei. Jede Probe wird mit  $100\ \mu\text{l}$  Assay – Puffer (CaCl  $5\ \text{mM}$ , NaCl  $140\ \text{mM/l}$ , HEPES  $10\ \text{mM/l}$ , BSA  $1\ \text{mg/ml}$ , pH bei  $7,5$ ) aufgefüllt. Schließlich wird dazu eine Reaktionsmischung aus  $93,5\ \mu\text{l}$  Assaypuffer,  $5\ \mu\text{l}$  Faktor X ( $10\text{mU}/\mu\text{l}$ ) (F-4634, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und  $1,5\ \mu\text{l}$  Faktor VIIa [27] ( $20\text{nM}/\mu\text{l}$ ) (73560, Alexis, Grünberg, Deutschland) hinzugegeben und  $10\ \text{min}$  lang bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit erfolgt die Faktor Xa – Aktivierung, die schließlich durch Zugabe von  $10\ \mu\text{l}$  EDTA ( $1\%$ ) gestoppt wird.

Zur Quantifizierung der Faktor Xa – Menge werden pro Probe  $10\ \mu\text{l}$  des Faktor Xa – sensitive chromogene Substrat S-2222 [28, 29, 30, 31] ( $4\ \text{mmol/l}$ ) hinzugegeben (Chromogenix, Moindal, Schweden) , von dessen Aminosäuresequenz Bz-Ile-Glu-Gly-Arg Faktor Xa der Farbstoff p-Nitroanilide abgespalten wird. Dadurch färben sich die Versuchsansätze innerhalb einer zweistündigen Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  gelb.

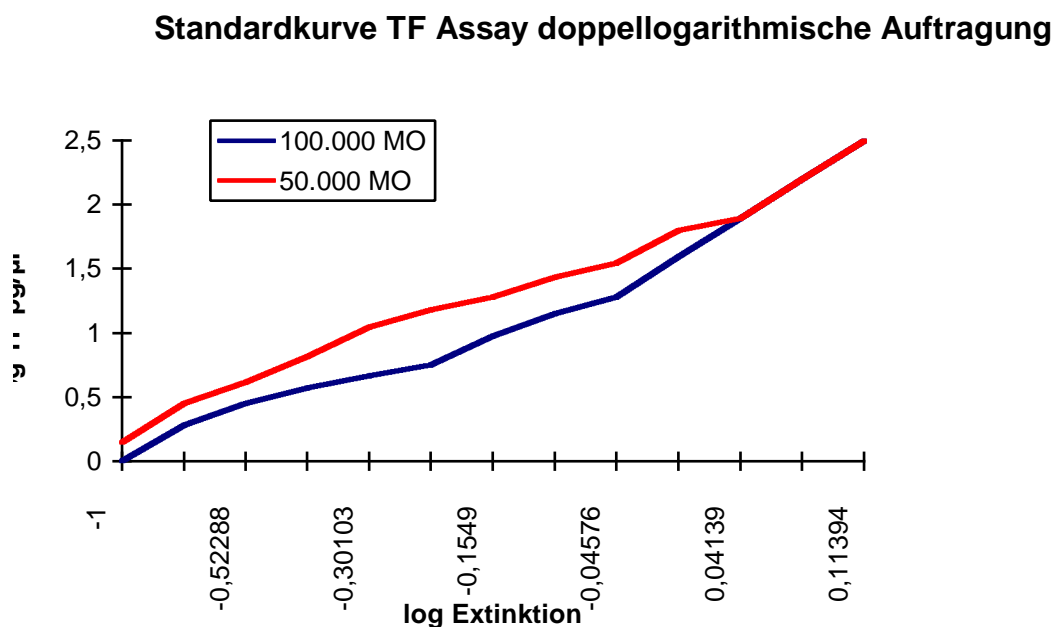
Mittels eines Plattenphotometers (Lab. Instruments GmbH, Salzburg, Österreich) wird die spezifische Extinktion des Farbstoffs bei einer Wellenlänge von  $405\ \text{nm}$  gemessen. Der Extinktionsgrad ist nach dem Eaton Lambertschen Gesetz von der gebildeten Faktor Xa – Menge abhängig. Die Tissue Factor – Menge ist der gebildeten Faktor Xa – Menge direkt proportional.

Anhand einer Standardaktivitätskurve, die über einen rekombinanten Tissue Factor (4500, American Diagnostica Inc, Greenwich, CT) [32] ermittelt wird, kann die Extinktion in  $\text{pg}/\mu\text{l}$  Tissue Factor Protein pro 50.000 Monozyten umgerechnet werden.

Diese Standard-Aktivitätskurve bezieht sich auf Tissue Factor - Konzentrationen von 1000 - 500 - 250 - 125 - 62 - 30 - 15 - 7,5 - 0  $\text{pg}/\mu\text{l}$  und wird mit einem rekombinanten (lipidierten) Tissue Factor entwickelt, der oben angegebenen Faktoren X und VIIa und Assay – Puffer enthält.

Die Bestimmung der gebildeten FXa – Menge erfolgt mit dem chromogenen Substrat S-2222 über einen Zeitverlauf von 0,5 - 1 und 2 Stunden. Die 2 Stunden – Standardkurve wird als Maß verwendet, da es vor und nach dieser Zeit zu unspezifischen Extinktionsergebnissen der Proben kommt.

**Abbildung 5: Tissue Factor – Assay Standardkurve**



## **2.4 RNA – Isolierung und Reverse – Transkriptase – Polymerase Kettenreaktion (RT – PCR)**

### **2.4.1 RNA – Isolierung mit dem Roti™ - Quick – Kit**

Voraussetzung:

Für die Tissue Factor – PCR werden Monozyten in einem Verhältnis von 3 Mio. Zellen pro Well auf 3ml MSFM Medium inkubiert. Je Versuchsansatz wird eine Probe bearbeitet.

Für die Isolierung der gesamten zellulären RNA wurde die acid – guanidinium – thiocyanat – phenol – chloroform – Methode nach Chomczynski und Sacchi verwendet [33].

Die RNA – Isolierung erfolgt mit sterilen Handschuhen, um eine RNA – Zerstörung durch ubiquitär vorkommende RNAsen zu vermeiden.

Am Ende des Stimulationsversuches wird jede Probe zweimal mit PBS gewaschen und dann mit 1ml Roti – Quick – Lösung 1 (Guanidinthiocyanat und Mercaptoethanol im Verhältnis 9:1) versehen. Dadurch werden die Monozyten lysiert und RNA freigesetzt. Dies wird zusammen mit 1 ml von Lösung 2, die vorher gut gemischt wurde, (Phenol und Chloroform im Verhältnis 1:24) in ein Eppendorf – Hütchen geben. Die beiden entstehenden Phasen werden kräftig gemischt, damit die RNA vollständig mit Lösung 2 in Kontakt kommt und bei Ausbildung zweier Phasen mit dieser die obere Phase bildet.

Nach 10 min Inkubation auf Eis wird erneut dreimal auf dem Vortex gemischt, bis die Lösungen weiß werden und sicher ist, dass die RNA vollständig von Lösung 2 aufgenommen wurde. Die beiden Phasen werden 15 min lang bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach 3 min Kühlung werden jetzt 2 Phasen sichtbar. Eine klare, obere Phase mit RNA wird abgehoben und weiterbearbeitet, die andere Phase aus

DNA und Proteinen sowie Zelltrümmern wird verworfen. Mittels Zugabe von 1 ml Lösung 3 (Isopropanol) wird unter zweimaligem Vortexen die RNA ausgefällt. Sie wird 3 Std bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. In einem erneuten Zentrifugationsschritt bei 10000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  15 min lang erhält man ein RNA – Pellet. Nach Abpipettieren des wässrigen Überstandes wird das RNA – Pellet in 300  $\mu\text{l}$  Lösung 1 und 300  $\mu\text{l}$  Lösung 3 aufgenommen und gemischt, um die RNA weiter aufzureinigen.

Bei  $-20^{\circ}\text{C}$  wird 30 min lang inkubiert und anschließend bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 130000 rpm RNA sedimentiert.

Sie wird einmal mit 500  $\mu\text{l}$  70%igem Ethanol gewaschen und 7 min lang bei 13000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert und auf Eis gelegt. Nach Entfernung des Alkohols sollte das RNA – Pellet kurz antrocknen, da verbleibende Alkoholreste die Messung der optischen Dichte beeinträchtigen. Dem Pellet wird eine seiner Größe entsprechende Menge Aqua dest. (20-40  $\mu\text{l}$ ) hinzugegeben und die optischen Dichte bei  $\lambda=260\text{ nm}$  und  $\lambda=280\text{ nm}$ , den beiden Absorptionsmaxima für RNA, gemessen.

#### **2.4.2 Gesamt – RNA – Bestimmung**

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) wird mit einem Perkon – Elmer – Lambda - Bio2.1UV/VIS – Spektralphotometer durchgeführt. Dabei werden zwei OD – Werte gemessen. Ein OD – Wert ( $\lambda=260\text{nm}$ ) gibt die RNA – Menge in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  an, der Quotient aus beiden OD – Werten gibt eine Aussage über den Reinheitsgrad der RNA (Referenzwerte: 1,6-2,0). 1,8 ist ein optimaler Wert.

#### **2.4.3 Herstellung einer einsträngigen komplementären DNA [cDNA] mittels**

##### **RT – PCR**

Die Synthese der komplementären DNA wird mit einem Tria Thermoblock – PCR – System (Biometra™, Deutschland) durchgeführt. 1  $\mu\text{g}$  RNA wurde zur Synthese einer einsträngigen cDNA verwendet.

Zunächst wird die RNA auf ein Volumen 1µl/µg und auf ein Endvolumen von 26,2µl mit Aqua dest. verdünnt, z.B. OD 1= 0,29 µg/µl, 1/OD1 = 3,49 µl/µg, 22,7µl Aqua dest. müssen hinzugefügt werden. Durch 10 min Inkubation bei 95°C wird die RNA räumlich gestreckt und damit für die reverse Transkriptase zugänglich. Der RNA (26,2µl) werden 23,8µl eines Mastermixes (Gesamtvolumen:50µl) für die Reverse Transkriptase hinzugefügt und bei 37°C 1 Std lang inkubiert. Damit sind die optimalen Parameter für die Anfertigung der cDNA erfüllt.

Der o.g. Mastermix besteht aus: 1 x first-strand Puffer (100 mmol/l Tris-HCl, pH 8.3, 10 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 50 mmol/l KCl), 10 mmol/l Dithiothreitol (DTT), 15 nmol/l randomisierte Hexanucleotide als Primer (Boehringer, Mannheim, Deutschland), 20U RNAsin (Promega, Madison, WI), 1 mmol/l von jeder dNTP (dATP, dCTP, dGTP und dTTP; Perkin Elmer, Norwalk, CT) und 100 U Moloney murine Leukämievirus – Reverse – Transkriptase (GIBCO BRL) in einem Endvolumen von 23,8 µl.

Am Ende der Inkubationszeit wird die cDNA eingefroren.

#### **2.4.4 Durchführung der PCR**

Für die PCR [34] verwendeten wir einen Mastermix (Gesamtvolumen 45,3 µl) aus: 22 µl H<sub>2</sub>O, 5µl 1x PCR-Puffer (Perkin Elmer), 5µl 1 mmol/l von jeder dNTP (dATP, dCTP, dGTP, und dTTP: Perkin Elmer), je 6 µl von spezifischen 5'- und 3'- Primern (Roth, Deutschland), 0,3 µl AmpliTaq DNA - Polymerase (Perkin Elmer) 1 µl F.A. und 4µl einer einsträngigen cDNA hinzugegeben (Endvolumen ca. 49,3 µl). Die Gensequenzen der intronkodierenden Tissue – Factor – spezifischen Primer waren: 5' GCC GCC AAC TGG TAG ACA TG 3' und 5' TAG CCA GGA TGA TGA CAA GG 3'. Die Gensequenzen des ständig exprimierten β – Aktin - Genes waren 5' AAA GAC CTG TAC GCC AAC ACA GTG CTG TCT 3' und 5' CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT G 3'. Für die Durchführung der Angiotensin II –

Rezeptoren (Subtyp 1 – Losartan – spezifisch) wurden die folgenden Primer verwendet [35]:

5' TTATTGATTCACTCTTCTAC 3' und 5' CGAACATGTCACTCAACCTC 3'. Die PCR wurde in einem PcR – Gerät (Biometra™ Tria Thermoblock) durchgeführt:

Initial wurden die beiden cDNA – Stränge voneinander bei 94°C 5 min lang getrennt, d.h. denaturiert.

Anschließend wurde die eigentliche Polymerase – Ketten – Reaktion durchgeführt. Die Abfolge von Denaturierung (Trennung) der komplementären PCR – Produkte, Hybridisierung (Annealing) der Primer an den PCR-Produkten und der Original – cDNA und Synthese weiterer PCR – Produkte (Extension, Verlängerung der DNA - Ketten) wurde den spezifischen PCR – Produkten angepasst:

Bei der  $\beta$  – Actin – PCR wurde 25 Zyklen 1 min bei 94°C denaturiert, 35 sek bei 60°C hybridisiert und 1,5 min bei 72°C lang extendiert.

Die Tissue Factor – PCR benötigte 35 Zyklen, bestehend aus 50 sek Denaturierung bei 94°C, 35 sek Primer – Annealing bei 61°C und 1,5 min langer Primerextension bei 72°C.

Bei der Angiotensin II – Rezeptor – PCR wurde 35 Zyklen 1 min lang bei 95°C denaturiert, 1 min 20 sek bei 61°C hybridisiert und 1 min lang bei 72°C extendiert.

Als Negativkontrollen wurde jeweils eine PCR ohne cDNA routinemäßig angefertigt. Dadurch wurden falsch – positive Amplifikationsprodukte ausgeschlossen.

Die Spezifität der gewonnenen Tissue Factor – PCR – Produkte wurden in unserem Labor mit Hilfe einer automatischen DNA – Sequenzierung (Modell 373A: Applied Biosystems, Überlingen, Deutschland) analysiert, und die resultierende cDNA – Sequenz mit der veröffentlichten menschlichen Tissue – Factor – Gen – Sequenz verglichen [36].

### 2.4.5 Gelelektrophorese

20 µl des PcR – Produktes werden zusammen mit 4 µl eines Ladepuffers gemischt, davon werden 20 µl auf 2% Agarosegel (Gibco – BRL™, Katalognummer: 540-5510UA) in einem TEA – Puffer (Tris-, EDTA-, Eisacid (=99% Essigsäure) - Puffer) gegeben und 1,5 Stunden lang bei 100 Volt in einem Spannungsfeld aufgetrennt. Unter einer UV – Lampe werden die Gele photographiert und für eine semiquantitative, densitographische Analyse mit dem Biometra – Biodoc – System eingescannt [37]. Das stets vorkommende Hintergrundrauschen wurde softwaregesteuert eliminiert und die Leuchtdichte der Banden ermittelt. Ein Quotient aus den Intensitäten der Banden der Tissue – Factor – PCR und  $\beta$  – Actin – PCR wurde gebildet (letztere dient als Referenzwert, weil sie von der Stimulation unabhängig ist) und diese mit dem Wilcoxon – Test ausgewertet. Es wurde ein Signifikanzniveau von 95% ( $p < 0,05$  angenommen).

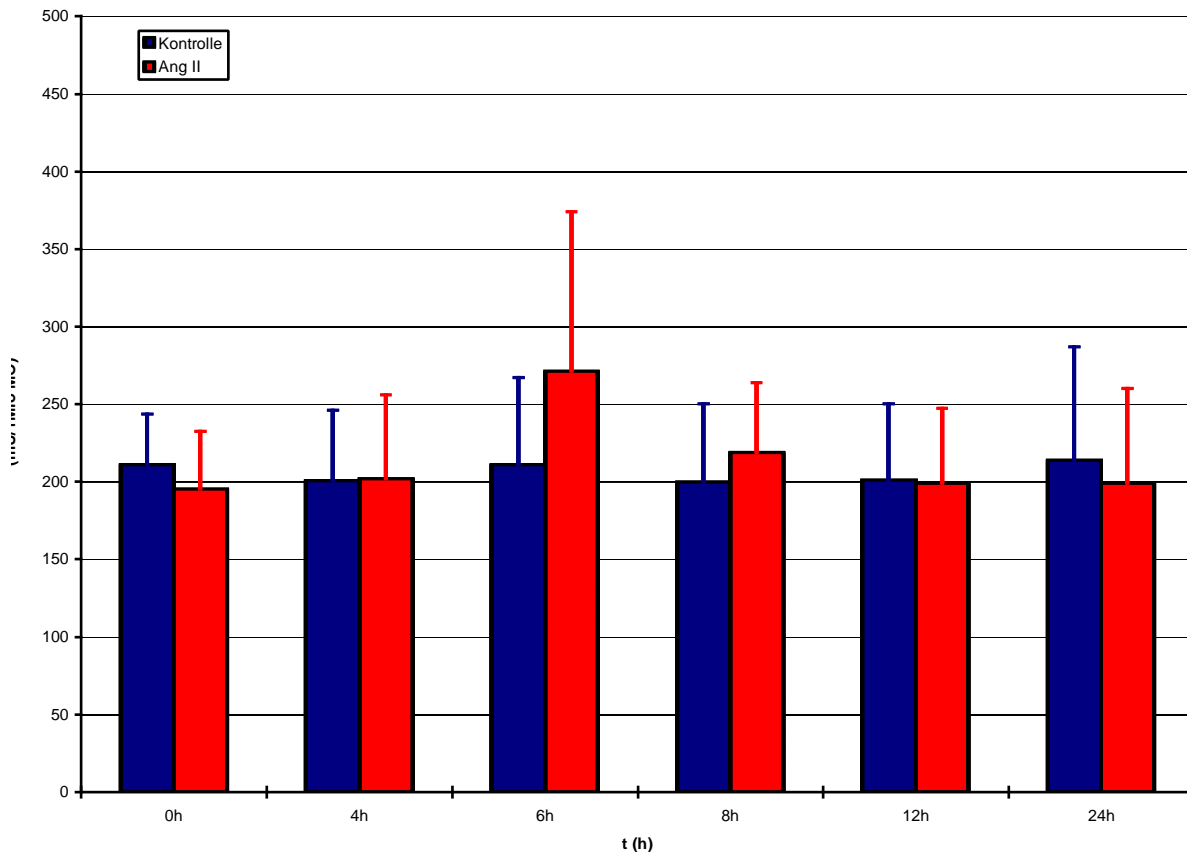
Die Angiotensin II – Rezeptor – PCR wurde aufgrund eines kleinen Stichprobenum – fanges rein qualitativ ausgewertet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Prokoagulatorische Aktivität (PCA)

Zunächst wurde bestimmt, mit welcher Angiotensin II - Konzentration und zu welchem Zeitpunkt sich eine signifikante Zunahme der Prokoagulatorischen Aktivität erzielen lässt. Dabei stellten sich eine Konzentration von  $10^{-7}$  mg/ml Ang II und eine sechsstündige Inkubation als optimale Parameter heraus (Diagramm 1).

**Diagramm 1: Effekt von  $10^{-7}$  mg/ml Angiotensin II auf die Prokoagulatorische Aktivität bei verschiedenen langen Inkubationszeiten**



Der Stichprobenumfang (n) betrug 12. Der nach 6 stündiger Inkubation mit einer Angiotensinkonzentration von  $10^{-7}$  mg/ml gezeigten signifikanten Effekt ( $p=0,026$ ) (Anstieg der PCA um 28,7%) ist flüchtig, da er bereits bei zwölfstündiger Inkubation aus dem Signifikanzniveau herausläuft.

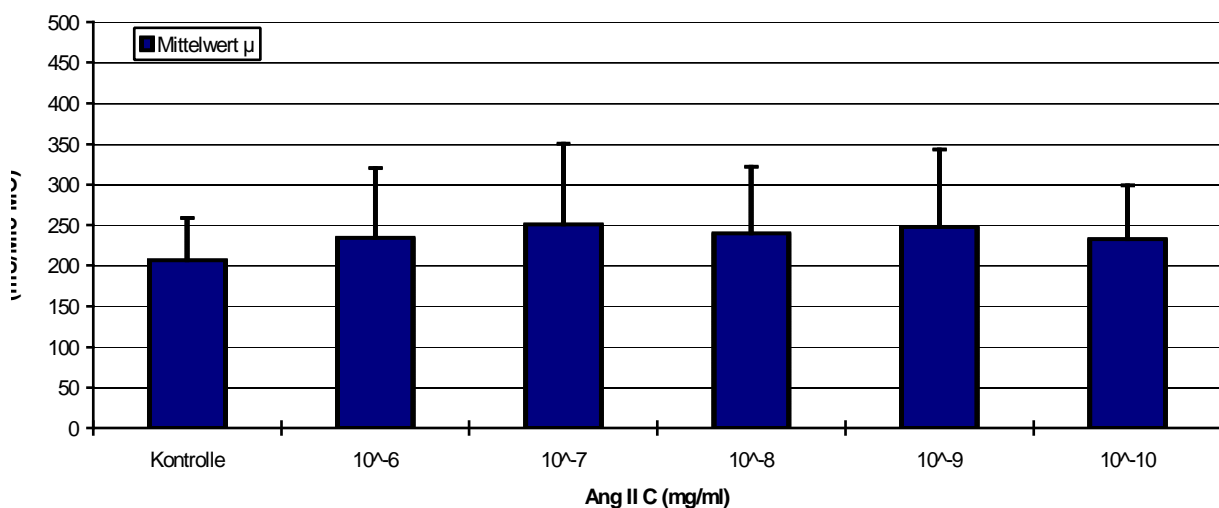
Die Kontrollen untereinander zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede, der Faktor Zeit hat somit keinen Einfluss auf die Tissue Factor – Expression.

**Tabelle zu Diagramm 1**

Inkubations-Zeit (s)	Kontrolle		Ang II 10 <sup>-7</sup> mg/ml		p-Wert
	MW (mU/10 <sup>6</sup> MO)	SA (mU/10 <sup>6</sup> MO)	MW (mU/10 <sup>6</sup> MO)	SA (mU/10 <sup>6</sup> MO)	
0h	210,8	32,6	195,4	37,0	0,286
4h	200,4	45,4	201,7	54,2	0,894
6h	210,8	56,4	271,3	102,3	0,026
8h	199,9	49,9	218,8	45,0	0,041
12h	200,8	49,4	198,8	48,4	0,894
24h	213,8	73,2	198,8	61,2	0,894

Die Analyse der Konzentrationsabhängigkeit erfolgte bei sechsständiger Inkubation in einem Bereich von 10<sup>-6</sup> bis 10<sup>-10</sup> mg/ml.

**Diagramm 2: Einfluss verschiedener Angiotensin II-Konzentrationen auf die prokoagulatorische Aktivität bei sechsständiger Inkubation**



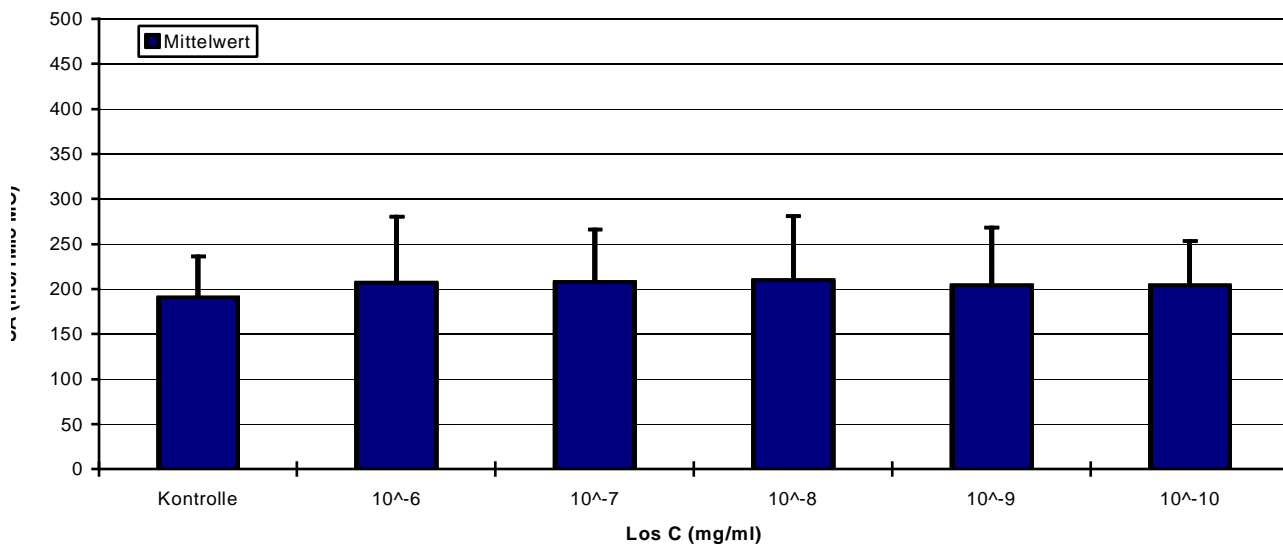
Bei sechsständiger Inkubation mit verschiedenen Angiotensin II – Konzentrationen zeigte nur eine Konzentration von 10<sup>-7</sup> mg/ml einen signifikanten Effekt auf die PCA (p=0,024). Der Stichprobenumfang (n) betrug 17.

Tabelle zu Diagramm 2

Angiotensin II C( mg/ml)	MW (mU/10 <sup>6</sup> MO)	SA (mU/10 <sup>6</sup> MO)	p-Wert Ang II vs. Kontrolle
Kontrolle	206,5	52,3	X
10 <sup>-6</sup>	234,1	85,8	0,158
10 <sup>-7</sup>	250,6	99,8	0,024
10 <sup>-8</sup>	239,7	82,5	0,064
10 <sup>-9</sup>	247,4	96,2	0,107
10 <sup>-10</sup>	232,9	65,7	0,060

Zum Ausschluss einer konzentrationsabhängigen Losartan – induzierten Tissue Factor – Synthese wurde bei 6 stündiger Inkubation ein Konzentrationsfenster für Losartan von 10<sup>-6</sup> bis 10<sup>-10</sup> mg/ml ausgewertet.

Diagramm 3: Prokoagulatorische Aktivität verschiedener Losartankonzentrationen nach 6h Inkubation



Die Untersuchung des Einflusses von Losartan auf die PCA zeigte bei sechsständiger Inkubation keinen statistisch signifikanten Effekt gegenüber den Kontrollen,  $p > 0,5$  (Diagramm 3). Der Stichprobenumfang (n) betrug 14.

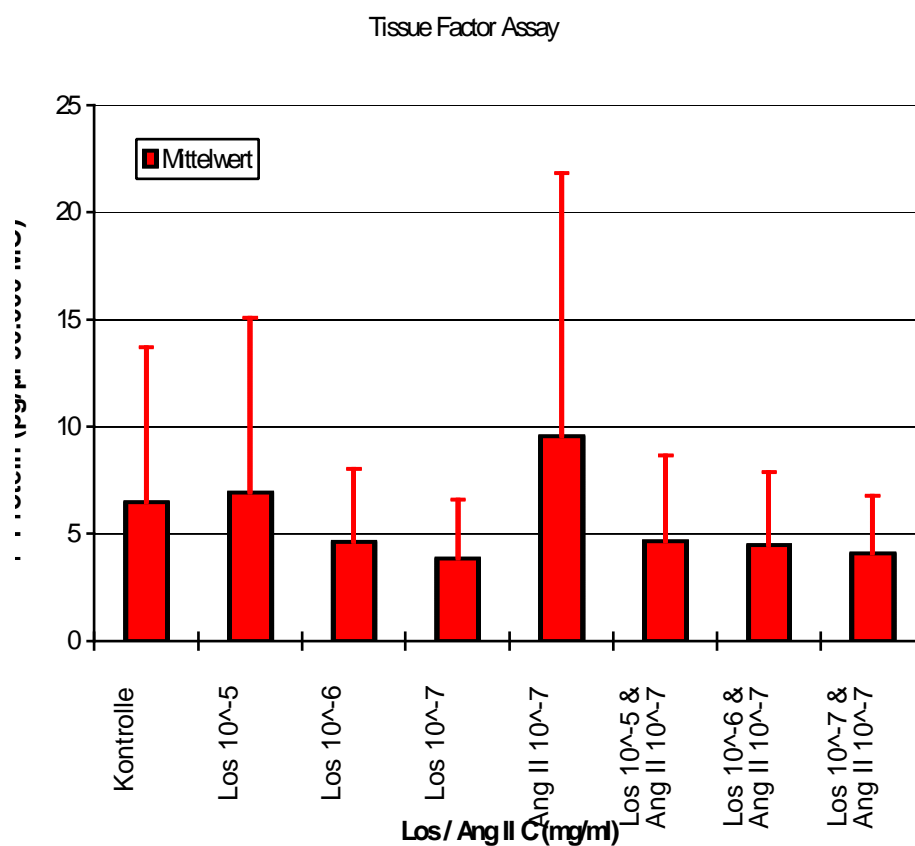
Tabelle zu Diagramm 3

Losartan C (mg/ml)	MW (mU/10 <sup>6</sup> MO)	SA (mU/10 <sup>6</sup> MO)	p-Wert
Kontrolle	191,1	45,3	X
10 <sup>-6</sup>	206,4	73,9	0,432
10 <sup>-7</sup>	207,5	58,0	0,442
10 <sup>-8</sup>	209,7	71,4	0,374
10 <sup>-9</sup>	203,9	64,3	0,484
10 <sup>-10</sup>	203,9	49,5	0,363

### 3.2 Tissue Factor Assay [TF – A]

Mit einer zweiten Methode sollte der Angiotensin II - Effekt der PCA überprüft werden.

Diagramm 4: Tissue Factor Assay nach 6h Inkubation



Im Tissue Factor – Assay bestätigte sich dieser nach sechsständiger Angiotensinstimulation ( $p=0,005$ ). Durch Antagonisierung mit Losartan wurde die Hypothese einer spezifischen Angiotensinwirkung auf die Tissue Factor – Bildung getestet. Losartan hemmte die Stimulation mit Angiotensin II in einer Konzentration von  $10^{-5}$  mg/ml signifikant ( $p=0,028$ ) (Diagramm 4), zeigte selbst aber keine Änderung der Tissue Factor – Expression ( $p>0,5$ ). Der Stichprobenumfang (n) betrug 10.

**Tabelle A zu Diagramm 4**

<b>C (mg/ml)</b>	<b>MW (pg/μl)</b> <b>50.000 MO)</b>	<b>SA (pg/μl)</b> <b>50.000 MO)</b>	<b>C (mg/ml)</b>	<b>MW (pg/μl)</b> <b>50.000 MO)</b>	<b>SA (pg/μl)</b> <b>50.000 MO)</b>
<b>Kontrolle</b>	6,48	7,22	<b>Ang II <math>10^{-7}</math></b>	9,56	12,26
<b>Los <math>10^{-5}</math></b>	6,91	8,17	<b>Ang II <math>10^{-7}</math> &amp;</b> <b>Los <math>10^{-5}</math></b>	4,66	4,02
<b>Los <math>10^{-6}</math></b>	4,63	3,38	<b>Ang II <math>10^{-7}</math> &amp;</b> <b>Los <math>10^{-6}</math></b>	4,46	3,40
<b>Los <math>10^{-7}</math></b>	3,85	2,73	<b>Ang II <math>10^{-7}</math> &amp;</b> <b>Los <math>10^{-7}</math></b>	4,09	2,67

**Tabelle B zu Diagramm 4**

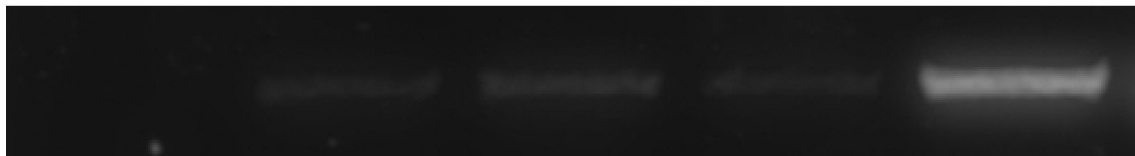
<b>Test Statistik</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Kontrolle vs. Ang II <math>10^{-7}</math> mg/ml</b>	0,005
<b>Kontrolle vs. Los <math>10^{-5}</math> mg/ml</b>	0,646
<b>Kontrolle vs. Los <math>10^{-6}</math> mg/ml</b>	0,445
<b>Kontrolle vs. Los <math>10^{-7}</math> mg/ml</b>	0,139
<b>Ang II <math>10^{-7}</math> mg/ml vs. Ang II <math>10^{-7}</math> &amp; Los <math>10^{-5}</math> mg/ml</b>	0,028
<b>Ang II <math>10^{-7}</math> mg/ml vs. Ang II <math>10^{-7}</math> &amp; Los <math>10^{-6}</math> mg/ml</b>	0,139
<b>Ang II <math>10^{-7}</math> mg/ml vs. Ang II <math>10^{-7}</math> &amp; Los <math>10^{-7}</math> mg/ml</b>	0,074

### 3.3 Semiquantitative PCR [sPCR]

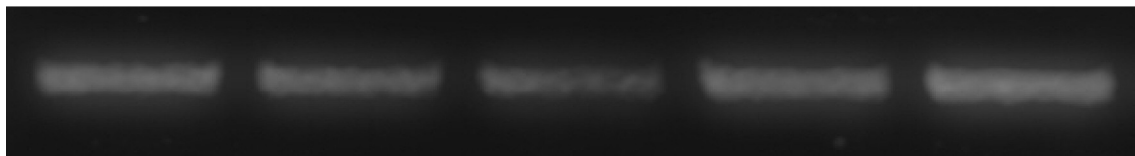
Als weiteres Verfahren zur Untersuchung einer Angiotensin II - induzierten Tissue Factor Synthese wurde eine semiquantitative PCR eingesetzt.

Abbildung 6: Tissue Factor-PCR Angiotensin II  $10^{-7}$  mg/ml

#### Tissue Factor PCR

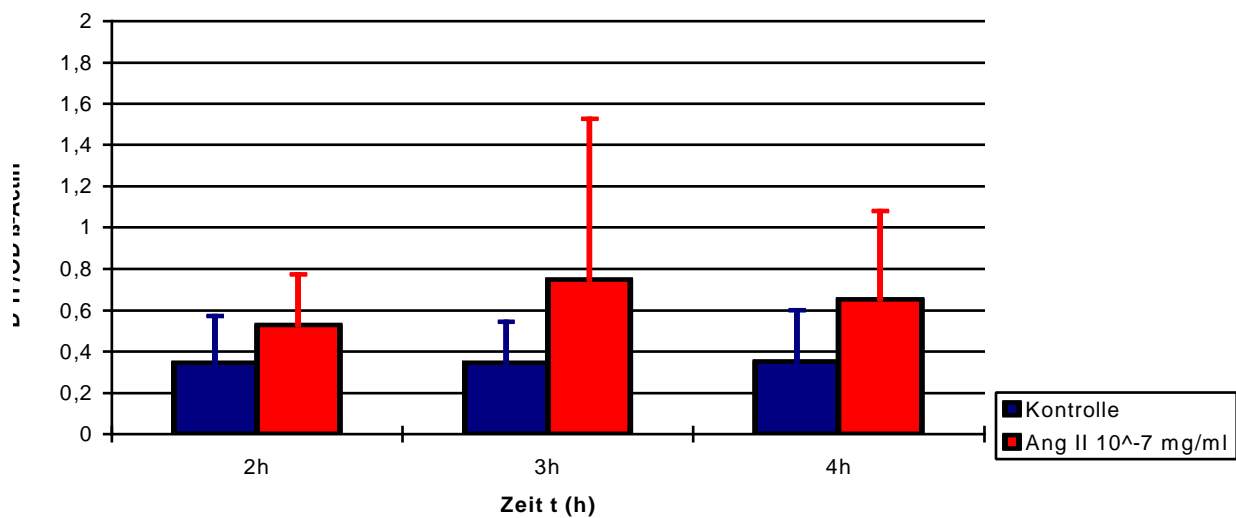


#### $\beta$ -Actin PCR



Kontrolle	Ang II $10^{-7}$ 2h	Ang II $10^{-7}$ 3h	Ang II $10^{-7}$ 4h	LPS $10\mu\text{g}$ 3h
	mg/ml	mg/ml	mg/ml	

Diagramm 5 : PCR Angiotensin II  $10^{-7}$  mg/ml vs. Kontrolle nach 2, 3 und 4 Stunden Inkubation



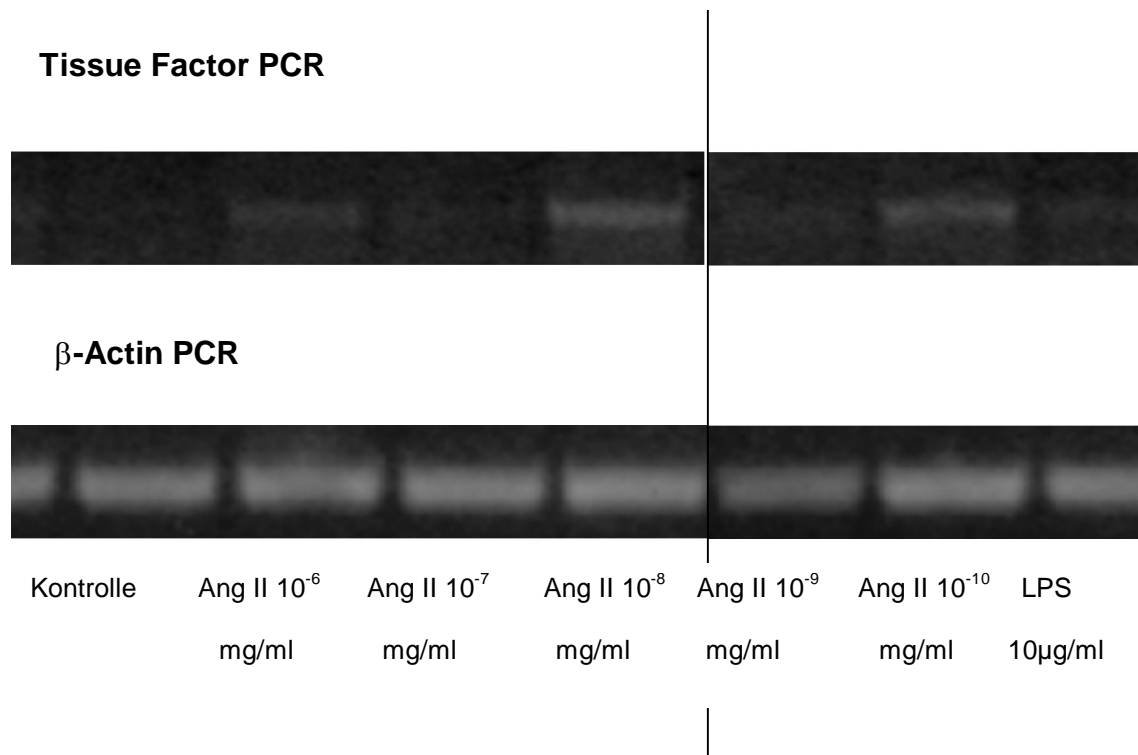
Mit ihr konnte nach 3h Inkubation ein statistisch signifikanter Effekt bei der bereits ermittelten Angiotensin II – Konzentration von  $10^{-7}$  mg/ml ermittelt werden ( $p= 0,021$ ) (Abbildung 4 und Diagramm 5). Der Stichprobenumfang (n) betrug 9.

**Tabelle zu Diagramm 5**

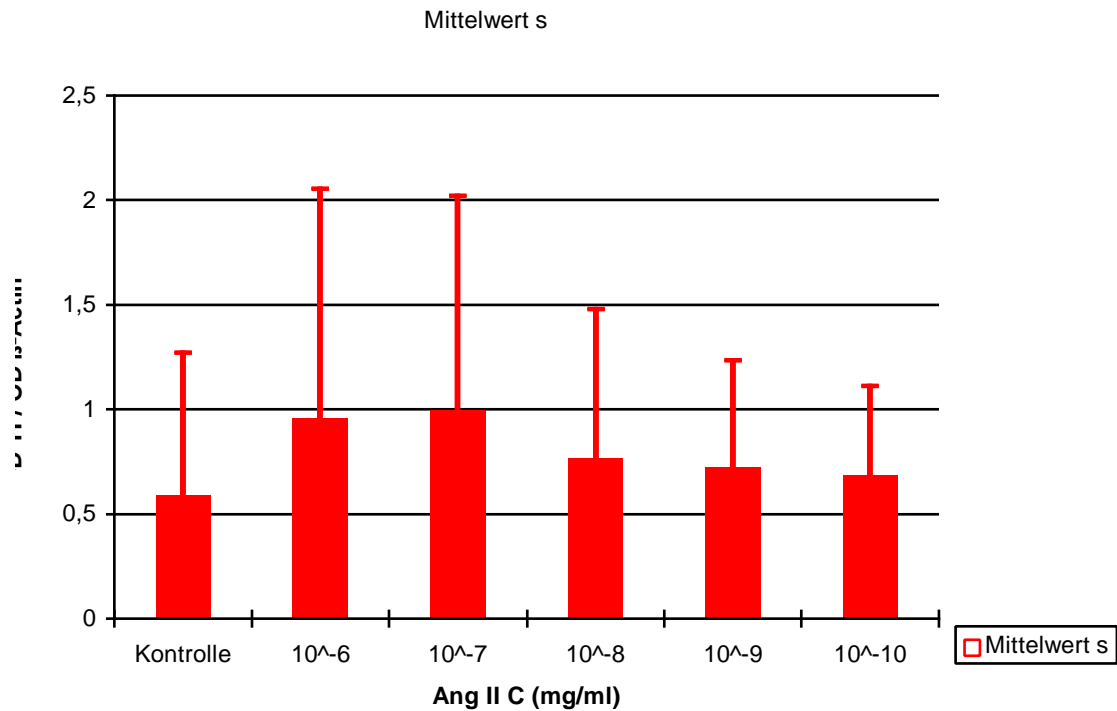
Zeit t (s)	Kontrolle	Kontrolle	Ang II $10^{-7}$ mg/ml	Ang II $10^{-7}$ mg/ml	p-Wert
2h	0,3457	0,2242	0,5267	0,2474	0,066
3h	0,3450	0,1978	0,7480	0,7769	0,021
4h	0,3494	0,2508	0,6513	0,4273	0,214

Geprüft wurde darüber hinaus die Konzentrationsabhängigkeit der Tissue Factor – mRNA in einem Konzentrationsfenster von  $10^{-6}$  bis  $10^{-10}$  mg/ml Angiotensin II.

**Abbildung 7 : PCR - verschiedene Angiotensin II-Konzentrationen nach 3h Inkubation**



**Diagramm 6: PCR Verschiedene Angiotensin II-Konzentrationen nach 3h Inkubation**



Eine Analyse verschiedener Angiotensin II – Konzentrationen nach 3 stündiger Inkubation bestätigte die Ergebnisse der PCA, bei der nur eine Angiotensin II – Konzentration von  $10^{-7}$  mg/ml einen signifikanten Effekt zeigte ( $p=0,015$ ). Der Stichprobenumfang (n) betrug 12.

**Tabelle zu Diagramm 6**

Angiotensin II C (mg/ml)	MW	SA	p-Wert
Kontrolle	0,5924	0,6779	X
$10^{-6}$	0,9585	1,0948	0,209
$10^{-7}$	0,9953	1,0235	0,015
$10^{-8}$	0,7684	0,7083	0,136
$10^{-9}$	0,7258	0,5088	0,241
$10^{-10}$	0,6862	0,4252	0,239

Mit dem Tissue Factor – PCR wurde die Hypothese überprüft, ob sich die Tissue Factor – mRNA – Synthese bei  $10^{-7}$  mg/ml durch Losartan antagonisieren lässt.

Abbildung 8: PCR – Angiotensin II  $10^{-7}$  mg/ml vs. Losartan nach 3h Inkubation

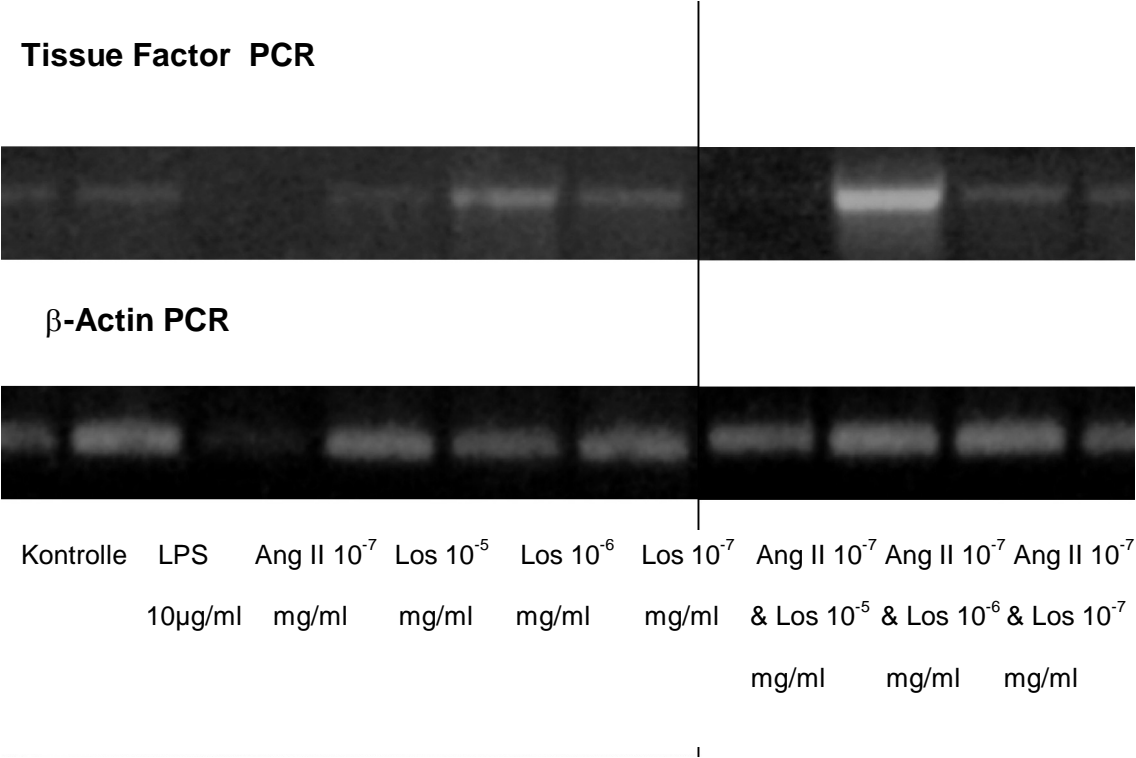
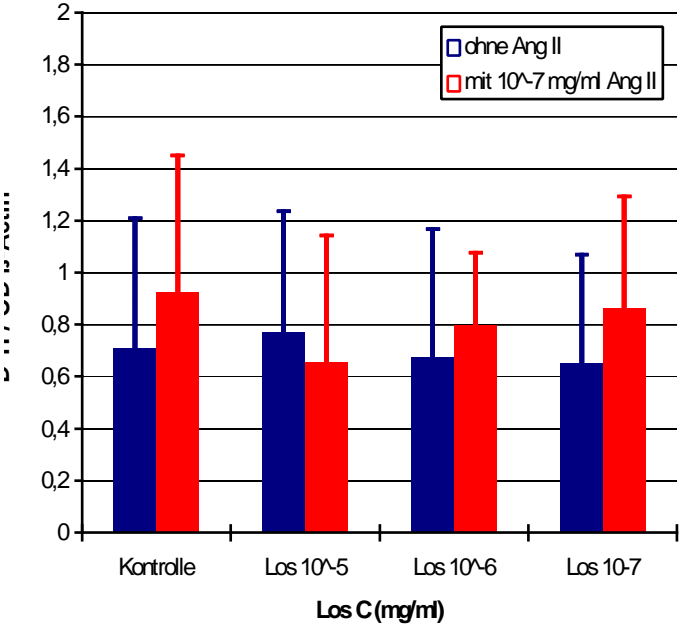


Diagramm 7: PCR Angiotensin vs. Losartan & Kontrolle nach 3h Inkubation



In der semiquantitativen PCR konnte die durch dreistündige Inkubation mit  $10^{-7}$  mg/ml Angiotensin II induzierbare Tissue Factor – mRNA Mehrsynthese mit einer Losartankonzentration von  $10^{-5}$  mg/ml analog der PCA signifikant senken ( $p=0,37$ ) (Abbildung 6 und Diagramm 7). Der Stichprobenumfang (n) betrug 10.

**Tabelle A zu Diagramm 7**

Los C (mg/ml)	Ohne Ang II	Ohne Ang II	Mit Ang II $10^{-7}$ mg/ml	Mit Ang II $10^{-7}$ mg/ml
	MW	SA	MW	SA
<b>Kontrolle</b>	0,7097	0,5012	0,9245	0,5249
<b>Los<math>10^{-5}</math></b>	0,7720	0,4655	0,6558	0,4890
<b>Los <math>10^{-6}</math></b>	0,6765	0,4930	0,7991	0,2775
<b>Los <math>10^{-7}</math></b>	0,6498	0,4185	0,8644	0,4288

**Tabelle B zu Diagramm 7**

Test Statistik 1 Kontrolle vs. Ang II/Los	p-Wert
Kontrolle vs. Los $10^{-5}$ mg/ml	0,285
Kontrolle vs. Los $10^{-6}$ mg/ml	0,575
Kontrolle vs. Los $10^{-7}$ mg/ml	0,386
Kontrolle vs. Ang II $10^{-7}$ mg/ml	0,037
Kontrolle vs. Ang II $10^{-7}$ & Los $10^{-5}$ mg/ml	0,575
Kontrolle vs. Ang II $10^{-7}$ & Los $10^{-6}$ mg/ml	0,333
Kontrolle vs. Ang II $10^{-7}$ & Los $10^{-7}$ mg/ml	0,074

**Tabelle C zu Diagramm 7**

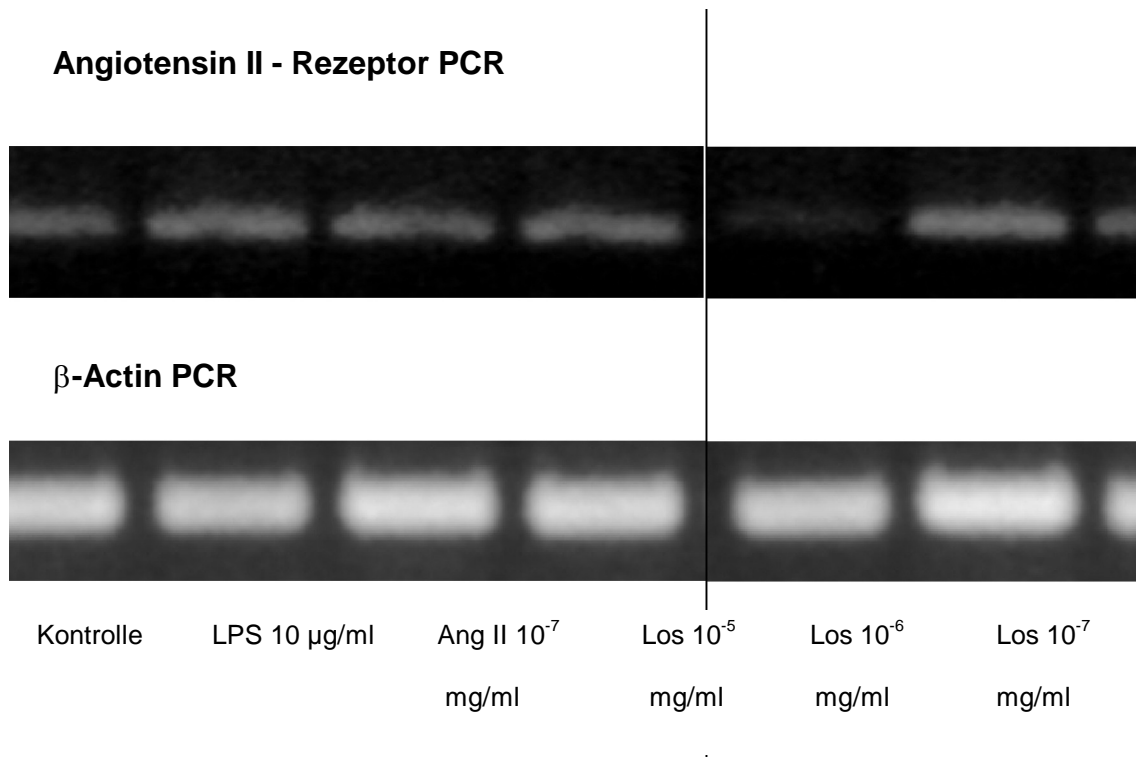
Test Statistik 2: Ang II vs. Los	p-Wert
Ang II $10^{-7}$ mg/ml vs. Los $10^{-5}$ mg/ml	0,139
Ang II $10^{-7}$ mg/ml vs. Los $10^{-6}$ mg/ml	0,017
Ang II $10^{-7}$ mg/ml vs. Los $10^{-7}$ mg/ml	0,047
Ang II $10^{-7}$ mg/ml vs. Ang II $10^{-7}$ & Los $10^{-5}$ mg/ml	0,037
Ang II $10^{-7}$ mg/ml vs. Ang II $10^{-7}$ & Los $10^{-6}$ mg/ml	0,386
Ang II $10^{-7}$ mg/ml vs. Ang II $10^{-7}$ & Los $10^{-7}$ mg/ml	0,386

Mit allen drei Verfahren kann ein statistisch signifikanter Angiotensin II – Effekt auf die monozytäre Tissue Factor – Synthese gezeigt werden. Untersucht wurden die Aktivität mit PCA und Assay und eine Tissue Factor – spezifische mRNA. Dieser Effekt lässt sich mit dem Angiotensin II - Antagonisten Losartan mit einer Konzentration von  $10^{-5}$  mg/ml selektiv hemmen und ist in zwei Methoden reproduzierbar. Eine zeitabhängige Veränderung der basalen Tissue Factor – Synthese lässt sich nicht beobachten.

### 3.4 Angiotensin II – Rezeptor – PCR

Die qualitative Analyse einer spezifischen Angiotensin – Rezeptor – mRNA diente als weiterer Beleg für eine Stimulierbarkeit von Monozyten durch Angiotensin II. Eine statistische Analyse wurde nicht durchgeführt.

Abbildung 9: Angiotensin – II – Rezeptor – PCR 3h



### 3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen eine kurzzeitige, aber signifikante Induktion von Tissue Factor in einem serumfreien In – vitro – Monozytenmodell durch Angiotensin II. Die effektive Angiotensin II – Konzentration beträgt  $10^{-7}$  mg/ml. Die Tissue Factor – Synthese erfolgt ähnlich rasch wie die von Lipopolysaccharid (LPS) induzierte Tissue Factor – Synthese [4, 24]. Bereits nach 3 Stunden Inkubation ist spezifische Tissue Factor – mRNA in der PCR und nach 6 Stunden eine Aktivitätszunahme in PCA und Assay nachweisbar.

Die Messung der Prokoagulatorischen Aktivität ist gegenüber dem Tissue Factor Assay weniger sensitiv, da die Freisetzung des membrangebundenen Tissue Factors mit einer deutlichen Streubreite behaftet ist. Die Ermittlung der Gerinnungszeiten bei der PCA lässt aufgrund einer Messgenauigkeit von Sekundenbeträgen nur eine annähernde Bestimmung der Aktivitäten zu. Dies ist bei einer Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) nur von untergeordneter Bedeutung, da hier eine Vervielfachung der monozytären Tissue – Factor – Expression nachweisbar ist (Multiplikationsfaktor 4-5) [24]. Der Tissue Factor – Assay stellte sich als sensitivere, quantitative Messmethode heraus.

Mit ihm und der Polymerase – Kettenreaktion konnten die Ergebnisse der PCA bestätigt werden. Die Koinkubation mit dem selektiven Angiotensin II – Rezeptor – Antagonisten Losartan führte zu einer vollständigen Hemmung der Tissue Factor – Expression. Dafür wurden  $10^{-5}$  mg/ml Losartan benötigt.

## 4 Diskussion

Der akute Myokardinfarkt ist die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen [38]. Pro Jahr versterben 400.000 Menschen in Deutschland an einem Herzinfarkt. Ein Infarkt entsteht fast immer durch einen akuten, thrombotischen Verschluss einer Herzkranzarterie [39]. Grundlage dafür sind arteriosklerotische Veränderungen an Koronargefäßen, die mit einer Plaquebildung einhergehen [8]. Risikofaktoren für diese Veränderungen sind u.a. die arterielle Hypertonie, Fettstoffwechselstörungen, Nikotinabusus, Diabetes mellitus [40, 41].

Die Ruptur von arteriosklerotischen Plaques und Freisetzung von großen Mengen thrombogenen Materials induziert eine akute Thrombozytenaggregation und aktiviert das Gerinnungssystem [7]. Darüber hinaus kommt es über eine vermehrte Endothelinausschüttung und Hemmung der NO – Synthese zu einer Vasokonstriktion. Am Ende resultiert eine akute, gefäßverschließende Thrombose [8].

Plaquerupturen oder Fissuren sind kein seltenes Ereignis. Man unterscheidet thrombogene von nicht – thrombogenen Plaques. Tissue Factor ist ein gerinnungsaktives Protein und induziert eine Gerinnung über das extrinsische System [42]. Tissue Factor wird in arteriosklerotischen Plaques vor allem auf Makrophagen nachgewiesen und zeigt je nach Grunderkrankung eine starke Variationsbreite. Bei Patienten mit instabiler Angina pectoris und akutem Myokardinfarkt sind die Tissue Factor – Mengen der Plaques deutlich größer als bei unkomplizierten Koronarsyndromen [43]. Tissue Factor gilt daher als ein prädiktiver Faktor für die Plaquethrombogenität [9, 44]. Neuere Untersuchungen belegen, dass nicht alle Leukozyten in Plaques Tissue Factor enthalten. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Zellen Tissue Factor zwar exprimieren können, diesen aber

sezernieren und somit für eine parakrine Wirkung verantwortlich sind, die ein lokales Thrombuswachstum befördert [45].

Gelingt im akuten Myokardinfarkt ereignis die Wiedereröffnung eines verschlossenen Gefäßes nicht, so zeigt sich in dem von diesem Gefäß versorgten Myokard eine Ischämie und eine Nekrose entsteht. Die Prognose des Infarktes hängt von der frühzeitigen revaskularisierenden Therapie ab [46]. Sie senkt erheblich die Mortalität und verbessert die Vitalität des betroffenen Myokardareals. Trotz effektiver Therapien versterben in den ersten 30 Tagen nach dem Infarkt ca. 5 bis 10% der Patienten [46, 47].

In der Postmyokardinfarktphase sind die Patienten neben nicht – kardialen Ursachen vor allem durch eine therapierefraktäre Herzinsuffizienz, einen Reinfarkt und malignen Herzrhythmusstörungen gefährdet [ 48, 49, 50].

Der therapeutische Einsatz von  $\beta$  - Blockern und Angiotensin – Converting – Enzym – Inhibitoren (ACE – Hemmern ) [50, 51] zur Behandlung der Herzinsuffizienz haben sich hier ebenso bewährt wie die Gabe von Acetylsalicylsäure zur Thrombozytenaggregationshemmung [49]. Die langfristige Senkung von hohen Cholesterinspiegeln verlangsamt den weiteren Progress der Arteriosklerose [52].

Wie bereits eingangs angeführt, exprimieren Monozyten ohne Stimulation keine signifikanten Tissue Factor – Mengen und verhalten sich damit anders als z.B. adventitiale Fibroblasten und einige andere Zellpopulationen [4, 53]. Es bedarf einer Stimulierung für eine Tissue Factor – Bildung. Lipopolysaccharid (LPS) induziert in unphysiologisch hoher Konzentration eine Vervielfachung von monozytärem, membrangebundenem Tissue Factor – Protein [15]. Ein ähnlicher Effekt ist von Endothelzellen bekannt [5, 6]. Durch die Endothelbarriere und diesen Induktions – mechanismus wird unter physiologischen Bedingungen somit eine unkontrollierte, vaskuläre Gerinnungsaktivierung verhindert. Im Blut zirkulierende Monozyten bilden

keinen Tissue Factor [15]. Somit wird eine umgezielte intravasale Gerinnung ausgeschlossen.

Bei der Arteriosklerose werden diese physiologischen Schutzmechanismen außer Kraft gesetzt. Die Endothelbarriere bleibt zunächst intakt, unter dem Einfluss verschiedenster Noxen [54] wandern vermehrt Monozyten in die Gefäßläsion ein und differenzieren sich. Neben der Zunahme des Verfettungsgrades ist auch eine Zunahme der Tissue Factor – Konzentration im Plaque feststellbar, wobei diese sich vor allem auf Makrophagen, mesenchymale Intimazellen, die extrazelluläre Matrix und [11] in koronaren Gefäßen auch auf glatte Muskelzellen verteilt [14]. Tissue Factor – Antigen und – mRNA dominieren vor allem in der Adventitia und weniger in der Media oder Intima [55]. Schaumzellen, Monozyten/Makrophagen und glatte Gefäßmuskelzellen bilden signifikant mehr Tissue Factor in solchen arteriosklerotisch veränderten als in gesunden Gefäßen [10].

Die Atherogenese ist ein schrittweiser Prozess: Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen produzieren zunächst einmal vermehrt Substanzen, die eine Monozytenmigration in den subendothelialen Raum fördern und diese Zellen aktivieren. Monocyte – Chemoattractant – Protein – 1 (MCP-1) und Monocyte – Stimulating – Factor (M-CSF) lösen eine Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen aus. Durch Aufnahme von Lipoproteinen verfetten diese und werden Schaumzellen. Diese primäre Fatty – Streak – Läsion des Gefäßes wird bei Persistenz der Noxe ein fibröser Plaque, in den vor allem fetthaltige Substanzen, wie Low density Lipoprotein (LDL), aufgenommen werden. Aktivierte Makrophagen interagieren mit der Gefäßwand und produzieren inflammatorisch wirksame Substanzen. Der Platelet – derived – growth – Factor (PDGF) z.B. induziert eine Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und fördert deren Einwanderung in die Fatty – Streak - Läsion. Durch eine Zunahme von MCP – 1 migrieren weitere

Monozyten in den Plaque. Andere von Endothelzellen und Gefäßmuskelzellen gebildete Substanzen sowie die Einwanderung und Aktivierung von T – Lymphozyten verändern den Plaque.

Stark oxidiertes LDL verhindert die Migration von Endothelzellen auf Plaques und verhindert so die Reparatur von Ulzerationen. Es ist toxisch für Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen und führt zur Nekrosenentstehung im Zentrum des Plaques. Der Untergang von Schaumzellen setzt Fetttropfchen frei. Diese werden von glatten Gefäßmuskelzellen aufgenommen, die dann ebenfalls zu Schaumzellen transformieren. Dadurch und durch Einwandern weiterer Monozyten und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen wächst der Plaque weiter. Dieses Wachstum vollzieht sich zunächst in Richtung auf die Adventitia, bis ein kritischer Punkt erreicht wird, an dem eine Expansion nicht mehr möglich ist. Jede weitere Volumenzunahme betrifft dann die Gefäßmedia des Plaques und führt zur Einengung des Gefäßlumens [56].

Auch oxidiertes LDL, wie es in den Plaques gefunden wird, induziert eine Tissue – Factor – Bildung von Monozyten und Endothelzellen und trägt damit zur Thrombogenität von Plaques bei.

Vor allem Plaques von Patienten mit instabiler Angina pectoris und akutem Myokardinfarkt erweisen sich als besonders lipid - und Tissue Factor - reich und sind vulnerabler (rupturgefährdeter) als bei Patienten mit stabiler Angina pectoris [43].

Neben vielen anderen Faktoren wie Superoxiden, Xanthinoxidasen und Myeloperoxidase haben auch Makrophagen einen wichtigen Anteil an der Oxidierung von LDL [57]. Mit ihrer eigenen Lipooxygenase tragen sie über die Bildung oxidierten LDL und von Peroxiden zum oxidativen Stress bei und unterhalten die Arteriosklerose und fördern somit die Thrombogenität [58, 59]. Dies geschieht auch unter dem Einfluss von Angiotensin II, das darüber hinaus auch den LDL – Uptake von Monozyten heraufreguliert [60].

Neben der lokalen koronaren Arteriosklerose kann bei Patienten im akuten Myokardinfarkt eine verstärkte systemische Gerinnungsneigung festgestellt werden [3], die u.a. auf eine erhöhte prokoagulatorische Aktivität von Blutmonozyten zurückgeführt wird.

Unter physiologischen Bedingungen machen Monozyten nur 10% der zirkulierenden Leukozyten aus. Außerdem produzieren sie keine signifikanten Tissue Factor – Mengen. Akute koronare Ereignisse sind aber in aller Regel mit einer milden Leukozytose assoziiert [61], so dass ein bedingter monozytärer Effekt auf die gesamte Gerinnungssituation nicht vollständig auszuschließen ist.

Im unkomplizierten Myokardinfarkt ist eine erhöhte Aktivität freien Plasma – Tissue Factors nachweisbar, dessen Herkunft in der Gefäßwand (Monozyten und glatte Muskelzellen) vermutet wird. Dieser Plasma – Tissue Factor kann unter einer vierwöchigen Therapie mit dem ACE – Hemmer Enalapril signifikant gesenkt werden. Dieser therapeutische Erfolg korreliert dabei gut mit der Senkung der Reinfarktrate [13]. Bereits vor dem akuten Ereignis kann bei Hochrisikopatienten (Diabetiker, Raucher und Patienten mit Fettstoffwechselstörung) eine Erhöhung von zirkulierendem, ungebundenem Tissue Factor festgestellt werden [62].

Eine Untersuchung von Napoleone und Coautoren an Monozyten von Patienten mit reduzierter linksventrikulärer Dysfunktion belegte den Benefit von ACE – Inhibition und Angiotensin II – Antagonisten (Losartan) auf die Reinfarktrate in dieser Klientel. Im Rahmen dieser Studie wurde die Wirkung von beiden Substanzgruppen auf die LPS – induzierte monozytäre Tissue Factor – Synthese untersucht. Beide Substanzgruppen senkten gleichermaßen dosisabhängig Tissue Factor – mRNA und Aktivität [63].

Die Wirksamkeit von ACE – Hemmern auf die Gerinnungssituation im akuten Infarkt hat einige Autoren das Vorhandensein eines gefäßeigenen Renin – Angiotensin – Systems vermuten lassen [64]. Dies wird von einer Reihe von Befunden gestützt. In Kokultur mit aktivierten Endothelzellen gehaltene Monozyten exprimieren vermehrt Tissue Factor. Dieser Effekt lässt sich mit dem ACE – Inhibitor Enalapril signifikant senken [65]. Darüber hinaus verfügen Makrophagen in arteriosklerotisch veränderten Gefäßen von koronarkranken Patienten über eine erhöhte Angiotensin – Converting – Enzym – Aktivität [66, 67]. Da in koronaren, makrophagenreichen Plaques große Mengen Angiotensin II gefunden werden [68], ist eine gefäßinterne Syntheseleistung wahrscheinlich. Weitere Bestandteile des Renin – Angiotensin – Systems sind in arteriellen Gefäßen nachweisbar. Angiotensinogen und Renin werden in Endothelzellen [69] und in der Gefäßmedia und - Adventitia gefunden [70, 71, 72, 73].

Da das Angiotensin – Converting - Enzym vor allem im Endothel [74] und in der Gefäßadventitia [75], nicht jedoch in der Gefäßmedia nachweisbar ist [76], wurde bislang von einer ACE – katalysierte Angiotensin II – Bildung an der luminalen Seite des Endothels [75, 77] – sowie in den Vasa vasorum der Adventitia ausgegangen.

Die Angiotensin II – Bildung ist ein komplexer Vorgang. Einige alternative Synthesewege sind beschrieben worden. Bestes Beispiel dafür ist der in der Gefäßadventitia vorzufindende Katalyseweg des chymostatinsensitiven – Angiotensin II – bildenden – Enzyms (CAGE) [78].

Differenzierte Makrophagen und monozytäre THP – 1 – Zellen verfügen über alle Merkmale eines Renin – Angiotensin – Systems [79, 80], während zirkulierende Blutmonozyten kein Angiotensin – Converting – Enzym enthalten [81]. In Monokultur gehalten, zeigen Monozyten an den ersten beiden Kulturtagen nur eine geringe ACE – Aktivität , die aber ab dem 3.Tag ein signifikantes Niveau erreicht [82].

Angiotensinogen, Renin , Angiotensin - Rezeptoren der Klassen 1 und 2 [AT<sub>1</sub>,AT<sub>2</sub>] und ACE werden während der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen vermehrt gebildet und reguliert.

Trophische, parakrine Effekte an den Gefäßen, wie Hypertrophie [83, 84], Proliferation der glatten Muskelzellen [85] und die Induktion von Transkriptionsfaktoren [86], werden dem lokalen RAS zugeschrieben und tragen zur Arteriosklerose bei.

Pathologisch erhöhte Plasma – Angiotensin II – Werte konnten weder im akuten Myokardinfarkt, noch bei der essentiellen Hypertonie gezeigt werden, so dass ein Einfluss des systemischen RAS bislang nicht belegt werden konnte [87, 88].

Dennoch lassen sich in gleicher Weise in Tiermodellen mit erhöhten Plasmarenin – und Angiotensin II – Spiegeln ähnliche Veränderungen wie bei der Arteriosklerose herbeiführen. Belegt werden konnte in solchen Versuchsansätzen die Wirksamkeit von ACE – Inhibition und AT<sub>1</sub> – Antagonismus auf die Monozyteninfiltration, auf die Ausbildung von Adhäsionmolekülen und inflammatorisch wirksame Substanzen sowie auf die Tissue Factor – Synthese [89, 90].

#### **4.1 Bisherige Untersuchungen zum Zusammenhang von Tissue Factor und Angiotensin II**

Der Zusammenhang von Angiotensin II und Tissue Factor – Synthese wurde bereits 1997 an einem kälberserumhaltigem In – vitro – Modell mit Rattenendothelzellen untersucht [91].

Mit einer semiquantitativen, densitometrischen Tissue Factor – mRNA – Analyse und der Bestimmung eines Tissue Factor – mRNA/GapdH – Quotienten konnte nach dreistündiger Inkubation mit Angiotensin II ein konzentrationsabhängiger Effekt auf die Tissue Factor – Synthese evaluiert werden. Tissue Factor – mRNA wurde bei

einer Angiotensin II – Konzentration von 100 nM ( $10^{-7}$  M) nach vierstündiger Inkubation max. exprimiert und nahm auf das Siebenfache zu. Erst nach 48 Stunden kehrten die Werte zu den Basiswerten zurück. Durch eine vierstündige Inkubation mit einer Losartankonzentration von 1000 nM ( $10^{-6}$  M) wurde dieser Effekt vollständig antagonisiert. 1000 nM ( $10^{-6}$  M) des Angiotensin II – Subtyp – 2 – Rezeptorantagonisten PD123319 (Research Biochemicals International, Matrick, MA, USA) hatten hingegen keinen hemmenden Einfluss.

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde mit einem chromogenen Tissue Factor – Assay die Tissue Factor – Aktivität unter Angiotensin II – Stimulation untersucht. Nach zwölfstündiger Stimulation mit Angiotensin II verfünffachte sich die Tissue Factor – Aktivität. Analoge Angaben zu einer selektiven Hemmung mit Losartan wie bei der Tissue Factor – mRNA – Bestimmung wurden nicht publiziert .

Studien an glatten Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten in einem In – vitro – Modell belegen ebenfalls die Induzierbarkeit einer Tissue Factor – Synthese [92].

Bereits 3-4 Stunden nach Inkubation mit 100 nM Angiotensin II wurde eine signifikante Zunahme an Tissue Factor – mRNA nachgewiesen, die allerdings rasch zu den basalen Werten zurückkehrte.

Analog dazu wurde die Tissue – Factor – Aktivität wurde in einem einstufigen Gerinnungsversuch gemessen und mit einer Standardaktivitätskurve verglichen. Bereits nach vierstündiger Stimulation war die Tissue Factor – Aktivität auf maximalen Niveau (ca. 400% des Kontrollwertes) und sank nach 24 Stunden auf die Ausgangswerte ab. Da die Tissue Factor – mRNA nur kurze Zeit nachweisbar war, die Aktivität aber lange Zeit erhalten blieb, schlossen die Autoren auf eine relativ lange Halbwertszeit des Tissue – Factor – Proteins [92].

Nach Veröffentlichung von Teilen der hier vorliegenden Arbeit auf dem 2<sup>nd</sup> Angiotensin – Receptor – Antagonism Congress in Monte Carlo erschien eine Studie

aus Japan, die den Einfluss von Angiotensin II auf Monozyten und u.a. deren Tissue Factor – Synthese untersuchte [93].

Auch sie zeigen einen aktivierenden Effekt von Angiotensin II auf die monozytäre Tissue Factor – Bildung. Die Ergebnisse und Untersuchungsmethodik unterschieden sich von der hier vorliegenden Arbeit in mehrerer Hinsicht.

Im Gegensatz zu dem von mir gewählten Versuchsdesign wurden die Monozyten dieser Arbeitsgruppe nicht gepoolt und in einem kälberserumhaltigen RPMI – Medium inkubiert. Die Inkubationszeiten der Monozyten in der Zellkultur vor Beginn der Angiotensin II – Stimulation waren deutlich länger als bei meinen Untersuchungen (48-72 h versus 24 h bei mir).

Nach vierundzwanzigstündiger Stimulation mit exogen zugeführtem Angiotensin II verdoppelte der Tissue Factor – Antigen – Spiegel konzentrationsabhängig und signifikant mit einem Maximum bei  $10^{-7}$  mol/l Angiotensin II auf  $10^5$  Monozyten

Die Tissue Factor – mRNA – Werte waren nach 24h Inkubation mit  $10^{-7}$  mol/l Angiotensin II ebenfalls maximal erhöht.

Mit dem selektiven Angiotensin II – Rezeptorantagonisten Candesartan und dem ACE – Hemmer Captopril wurde überprüft, ob sich die Angiotensin II – Wirkung auf die Tissue Factor – Expression hemmen lässt. Um den Differenzierungsgrad der Monozyten zu Makrophagen in Kultur zu erfassen, wurden die Versuche in drei Ansätzen bestimmt: Dabei wurden die Monozyten einen, drei und sieben Tage in Zellkultur gehalten. Gemessen wurden der Tissue Factor – mRNA und – Antigen Spiegel nach vierundzwanzigstündiger Stimulation mit Angiotensin II und Candesartan oder Captopril. Eine Konzentration von  $10^{-8}$  mol/l Candesartan hemmte die angiotensininduzierte Tissue Factor – Expression nach vierundzwanzigstündiger Zellkultur nur leicht. Erst bei dreitägiger Inkubation der Monozyten in Kultur war der hemmende Effekt auf Tissue Factor – mRNA und – Antigen genauso ausgeprägt

wie bei Captopril. Darin sahen die Autoren einen Beleg, wie sehr die Induzier – und Hemmbarkeit der Tissue Factor – Synthese bei Monozyten von deren Differenzierungsgrad abhängig ist.

Betrachtet man alle oben aufgeführten Ergebnisse, so differiert die Tissue Factor – Synthese bei den einzelnen Zellentitäten sowie zwischen Monozyten und Makrophagen bezüglich der Quantität und der zeitlichen Abfolge. Insbesondere das Auftreten spezifischer mRNA und das Vorliegen eines aktiven Tissue Factor – Proteins varriieren stark.

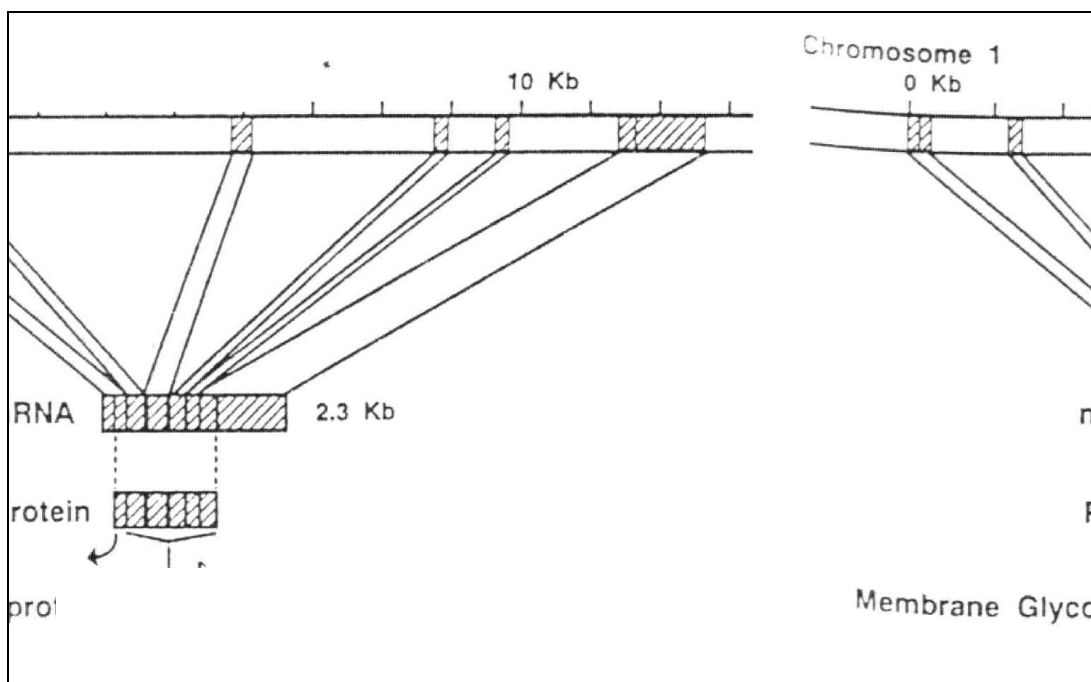
Zur Tissue Factor – Synthese liegen bislang folgende Ergebnisse vor: Das Tissue Factor – Protein hat ein Molekulargewicht von  $M_G=44.000$  Dalton und besteht aus einer einzigen Polypeptidkette mit 263 Aminosäuren. Das entsprechende Gen (ohne Promoter und regulierende Gene) umfasst 12,4 kbp und besteht aus 6 Exons, die durch 5 Introns unterbrochen werden [94], und ist auf Chromosom 1 in Position p21-22 lokalisiert [95, 96]. Die 5'-Region des 1. Exons kodiert die Initiierung der Translation, die 3'-Region kodiert eine 32 Aminosäuren umfassende Sequenz. Exon 2 bis 5 kodieren den extrazellulären Anteil des Proteins, während Exon 6 den membrangebundenen und cytoplasmatischen Anteil kodiert [97].

Während der Translation entstehen 2,2 und 2,3 kb umfassende mRNA – Stränge [95,98]. Größere Tissue Factor – mRNA – Sequenzen werden auf ein ineffektives Splicing von Introns zurückgeführt. Die 2,2 kb umfassende mRNA ist in Gefäßzellen instabil und hat eine Halbwertszeit von 48-90 min [96]. Es gibt Hinweise auf Faktoren, die diese mRNA stabilisieren, z.B. ist bei Endothelzellen die Halbwertszeit der Tissue Factor – mRNA nach einstündiger Inkubation mit Lipopolysacchariden (LPS) 12 mal länger als nach vierstündiger Inkubation [99]. Ein ähnlicher Effekt ließ

sich bei Stimulation von THP – 1 – monozytären Zellen nach LPS – Exposition zeigen [100].

Unterschiedliche Halbwertszeiten der Tissue Factor – mRNA sind bei Endothelzellen, Monozyten/Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen wahrscheinlich und können u.a. erklären, warum das Zeitintervall zwischen Auftreten der mRNA und des aktiven Tissue Factor Proteins zwischen den vorgenannten drei Zellentitäten stark variiert.

**Abbildung 10: Schema zur Tissue Factor Synthese**

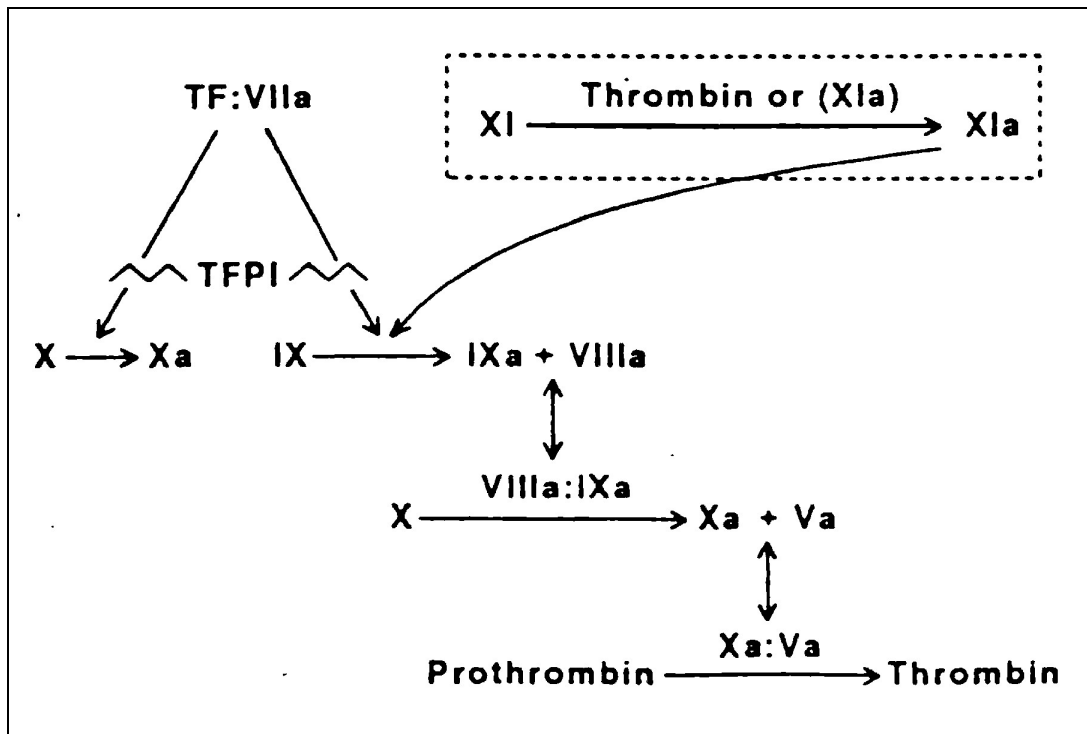


**Modifiziert nach [101].**

Das primäre Translationsprodukt ist ein 295 Aminosäuren umfassendes Protein, das über ein posttranslationales Processing um 32 Aminosäuren auf 263 Aminosäuren reduziert wird. Die extrazelluläre Domäne wird von 219 Aminosäuren gebildet und besteht aus 2 Untereinheiten mit einer homologen Sequenz zum Human – Growth – Factor – Rezeptor [102, 103]. Sie ist für die Komplexbildung von Tissue Factor mit dem Gerinnungsfaktor VII verantwortlich (Dissoziationskonstante  $K_D=10^{-10}$  mol/l beim Menschen), ohne die eine Aktivierung von Gerinnungsfaktor Faktor X und Aktivierung des extrinsischen Gerinnungspfades nicht stattfinden würde [42, 104].

Über Faktor IX kann Tissue Factor aber auch den intrinsischen Pfad der Gerinnung initiieren [105].

**Abbildung 11: Schema der durch den Tissue Factor - Faktor VII - Komplex initiierten Blutgerinnung**



Faktor VII bindet mit derselben Affinität an Tissue Factor wie Faktor VIIa. Nach Komplexbildung mit Tissue Factor wird Faktor VII von Faktor Xa aktiviert. TFPI = Tissue Factor Pathway Inhibitor. Modifiziert nach [42]

#### 4.2 Bewertung der Befunde

Die Ergebnisse der aufgeführten Untersuchungen belegen eine unterschiedliche Abfolge und Ausprägung der Tissue Factor – Bildung auf einen exogenen Angiotensin II – Stimulus. Geschwindigkeit und Syntheseleistung von spezifischer mRNA und Protein variieren zwischen den genannten Zellpopulationen deutlich. Bei Monozyten zeigte sich als weiterer Einflussfaktor der Differenzierungsgrad zu Makrophagen. Vor diesem Hintergrund erlangen die hier vorgelegten Ergebnisse eine andere Interpretation.

Aufgrund des unterschiedlichen Studiendesigns (anderes, serumfreies Medium, anderer Angiotensin II – Rezeptorantagonist andere Monozytenzahl pro Kultur und andere Inkubationszeiten, gepoolte Monozyten) ist eine direkte Befund – vergleichbarkeit mit der Studie von Nagata und Coautoren [93] nicht gegeben.

Meine Ergebnisse bestätigen aber einmal mehr den Zusammenhang zwischen einem lokalen, monozytären Renin – Angiotensin – Systemen und der Aktivierung des Gerinnungssystems über den Tissue Factor – Pathway. Wesentliche Einflussgröße auf die Unterschiede in den Ergebnissen ist sehr wahrscheinlich der Differenzierungsgrad der Monozyten in beiden Untersuchungen. Dieser findet Ausdruck in den verschiedenen langen Inkubationszeiten der Monozyten. Weitere mögliche Einflussfaktoren auf die Tissue Factor – Bildung sind methodisch bedingt. Die Verwendung von Kälberserum, die Wahl des Kulturmediums und die Auswahl der Monozyten (einzelne Patienten vs. Monozytenpooling) sind als unbekannt Variablen zu berücksichtigen.

#### **4.3 Einfluss der monozytären Differenzierung auf deren Tissue Factor – Expression**

Der Einfluss des monozytären Differenzierungsgrades auf die Tissue Factor – Bildung wurde von Van den Eijnden und Coautoren untersucht [106]. Ausgangspunkt der Analyse war die Beobachtung, dass zirkulierende Monozyten ohne Stimulation keinen Tissue Factor bilden, Makrophagen und Schaumzellen in Plaques hingegen große Mengen Tissue Factor in die subintimale, extrazelluläre Matrix sezernieren [107, 108].

An Teflonmembranen suspendierte und an Plastikschalen adhärente Monozyten wurden in vitro in einem serumhaltigen Medium auf monozytäre und makrophagen – spezifische Rezeptoren (Scavengerrezeptor, CD71, Mannoserezeptor) untersucht.

Eine signifikante Expression der makrophagenspezifischen Rezeptoren konnte ab dem 3. Tag in Kultur festgestellt werden.

Gleichzeitig wurde die Tissue Factor – Bildung mittels spezifischer mRNA, Antigen – und Aktivitätsbestimmung ermittelt.

Tissue Factor – mRNA war bei suspendierten Monozyten am 2.-5. Tag (Maximum am 3. Tag) und bei adhärennten Monozyten am 4.-7.Tag am stärksten ausgeprägt. Ein Antigen – und Aktivitätsmaximum konnte bei beiden Zellpopulationen zeitgleich vom 3.-7. Tag (Maximum 4. Tag) festgestellt werden, wobei die suspendierten Zellen deutlich höhere Werte aufwiesen. 95% aller Zellen waren zu diesem Zeitpunkt CD71 positiv, wiesen somit also makrophagentypische Eigenschaften auf.

Gleichzeitig wurde die Stimulierbarkeit der Zellen mit Lipopolysaccharid (LPS) überprüft. Sie war zu allen Zeitpunkten möglich, zeigte aber während des Maximums der spontanen Tissue Factor – Expression die schwächste Induzierbarkeit. Kontaminationen der Baselinekulturen mit LPS wurden ausgeschlossen.

Diese Ergebnisse belegen eine spontane, im wesentlichen vom monozytären Differenzierungsgrad abhängige Tissue Factor – Bildung, die mit der Expression makrophagenspezifischer Rezeptoren gekoppelt ist und nach der Monozytentransformation sistiert. Daraus lässt sich ableiten, dass unter den Tissue Factor – positiven Zellen in arteriosklerotischen Plaques ein hoher Anteil solcher in Differenzierung befindlicher Monozyten ist. Diese stehen darüber hinaus unter anderen Einflüssen, wie z.B. von Cytokinen und Hormonen.

Auch auf die Expression von monozytären Angiotensin II – Rezeptoren konnte bei dieser Studie ein Nachweis des monozytären Differenzierungsgrades nachgewiesen werden.

Die mRNA von monozytären Angiotensinrezeptoren und Angiotensin – Converting – Enzym wurden mittels Reverse – Transkriptase – Polymerase – Kettenreaktion nach

ein – und siebentägiger Zellkultur gemessen. 7 Tage nach Inkubation hatte die ACE – mRNA gegenüber den frisch isolierten Zellen deutlich zugenommen, während die AT<sub>1</sub> – und AT<sub>2</sub> – Rezeptor – mRNA stark abnahm. Die Autoren konnten den Mechanismus dafür nicht erklären, vermuten jedoch, dass diese Veränderungen Ausdruck für den Differenzierungsgrad der Monozyten sind. Ähnlich verhielt es sich mit dem Monocyte – Chemoattractant – Protein – 1 [MCP – 1], dem bedeutendsten chemoattrahierende Faktor von Monozyten bei der Migration in den subendothelialen Raum im Rahmen der arteriosklerotischen Plaquebildung. Die Synthese dieses Proteins (von Makrophagen, Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen) kann in mit dem ACE – Inhibitor Quinalapril im Frühstadium der Arteriosklerose gehemmt werden, später jedoch nicht mehr [109].

Okamura und Coautoren [80] beschäftigten sich ebenfalls mit dem Einfluss der Monozytendifferenzierung auf die Regulation des Renin – Angiotensin – Systems. Sie untersuchten menschliche Leukämie Zellen THP – 1 als Monozytenmodell sowie THP – 1 – Zellen unter dem 24stündigen Einfluss von Phorbol – 12 – Myristat – 13 – Azetat als differenziertes Makrophagenmodell und stellten fest, dass ACE – Aktivität und – mRNA ebenso wie die Angiotensin II – spezifischen Rezeptoren bei der Differenzierung heraufreguliert werden (ACE um den Faktor 3-4,5, AT<sub>1</sub> – und AT<sub>2</sub> – Rezeptor auf das Sechsfache. Dieser Effekt hielt sieben Tage lang vor, wurde aber durch die 24stündige Zugabe von exogenem Angiotensin II deutlich heruntergeregelt, wobei die Makrophagen immerhin noch dreifach höhere Rezeptordichte und ACE – Aktivität zeigten als Monozyten [80].

Monozyten/Makrophagen sind also in der Lage ihr Renin – Angiotensin – System entsprechend ihrem Differenzierungsgrad zu modulieren. Sie können sich dadurch an die pathophysiologischen Bedingungen im arteriosklerotischen Plaque anpassen.

Die Angiotensin II – Rezeptorendichte ist für diese Anpassung ebenso ein Marker wie ACE – Aktivität und Angiotensin II – Synthese.

#### **4.4 Angiotensin II – Tissue Factor – Response: Ausdruck zellulärer Spezialisierung?**

Warum zeigen Endothelzellen, Monozyten/Makrophagen und glatte Gefäßmuskelzellen unterschiedliche Reaktionen auf die gleiche stimulierende Substanz?

Taubman und Coautoren [92] untersuchten die seruminduzierte Tissue Factor – Synthese von glatten arteriellen Gefäßmuskelzellen und verglichen sie mit den Literaturangaben zu Monozyten und Endothelzellen. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede bezüglich der Quantität und des Zeitfensters der Tissue Factor – Reaktion. Glatte Gefäßmuskelzellen weisen eine ausgeprägte Abhängigkeit der Tissue Factor – Synthese von der Anzahl der Passagen in Kultur auf, wobei die Tissue Factor – Aktivität in frühen Passagen ausgeprägter als in den späteren war. Venöse glatte Gefäßmuskelzellen verhalten sich hingegen anders: Die Serumstimulation steigert hier erst nach einem 24stündigen Intervall die Tissue Factor – Synthese signifikant [110].

Aufgrund der unterschiedlichen Verteilung im Gefäß und den physiologischen Aufgaben der Zellen fassten die Autoren diese Unterschiede als Ausdruck einer Spezialisierung auf, die eine ungeordnete Gerinnung verhindert.

Die angiotensininduzierte Tissue Factor – Synthese ähnelt diesem Modell und kann ebenfalls als ein funktioneller Anpassungsmechanismus von Zellen an das Umgebungsmilieu verstanden werden.

Bei der Arteriosklerose verändert sich das Milieu wie bereits eingangs dargelegt schrittweise. Die zunächst niedrig differenzierten Monozyten transformieren zu

Makrophagen und regulieren ihr Renin – Angiotensin – System nach oben [80]. Mit der Synthese von eigenem Angiotensin II nehmen sie wie Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen Einfluss auf ihre Umgebung und sich selbst. Durch die Sezernierung von Cytokinen und die Aktivität von Lymphozyten und Granulozyten ist die Arteriosklerose im Grunde ein inflammatorischer Prozess [111]. Monozytäres Interleukin – 6 als Beispiel wird durch Angiotensin II induziert und findet sich in erhöhtem Maße auch in der Zirkulation bei Patienten mit akutem Herzinfarkt [67]. Über andere Cytokine, wie IL1- $\beta$ , MCP – 1 und TNF $\beta$  wird die Plaquethrombogenität, aber auch die allgemeine Gerinnungsaktivität reguliert [112]. Ursache hierfür ist z. T. die Tissue Factor – Aktivität zirkulierender Monozyten. Nach den von mir vorgelegten Ergebnissen und der Tatsache, dass diese Zellen nur ein rudimentäres RAS besitzen, dürfte Angiotensin II für die Tissue Factor – Expression peripherer Monozyten nur eine untergeordnete Bedeutung haben.

Neben der ACE – Inhibition und dem AT<sub>1</sub> – Antagonismus sind auch andere Therapiestrategien untersucht. Die direkte Tissue Factor – Inhibition ist ein Konzept um der Gerinnungsstörung und den inflammatorischen Effekten von Tissue Factor direkt entgegenzuwirken [113]. Die Beobachtung, dass die Hemmung von Tissue Factor die Leukozyteninfiltration in den Herzmuskel herabsetzt, belegt den Stellenwert solcher Konzepte. Tissue Factor Pathway – Inhibitor (TFPI), eine im Plasma und Blutplättchen vorkommende Proteinase und physiologischer Tissue Factor – Antagonist, ist beim akuten Myokardinfarkt ebenfalls erhöht. Mehrere Untersuchungen belegen jedoch eine nur teilweise Antagonisierung der Tissue Factor – Wirkung durch TFPI in der akuten thrombogenen Situation [16, 114].

#### 4.5 Angiotensin II – Rezeptor und Signaltransduktion

Angiotensin II wirkt auf verschiedene Rezeptortypen: Am besten untersucht sind derzeit der AT<sub>1</sub> – und der AT<sub>2</sub> – Rezeptor, die beide auf Monozyten gefunden werden und sich durch ihre Affinität zu Losartan bzw. PD123319 unterscheiden [115]. Der Losartan – spezifische AT<sub>1</sub> – Rezeptor ist ein klassischer Vertreter eines G – Protein gekoppelten Moleküls und führt unter Stimulation zur Aktivierung von Tyrosinphosphorylasen und Proteinkinasen [116]. Er aktiviert bei Endothelzellen der Kernfaktor nf – kappa B (NF - κB) und vermittelt so die Transkription der Tissue Factor – DNA und – Protein – Expression.

Bei glatten Muskelzellen ist die Tissue Factor – mRNA – Bildung durch Angiotensin II von einer Mobilisierung intrazellulären Calciums abhängig und kann mit Calciumchelaten gestoppt werden. Bei Signaltransduktion über das Protoonkogen c - fos führt eine Hemmung der Proteinkinase C zur Hemmung der Tissue Factor – mRNA – Bildung. Bei der Angiotensin II – Tissue Factor – Signaltransduktion hat eine Hemmung der Proteinkinase C aber keinen hemmenden Einfluss auf die spezifische mRNA, so dass dieser Weg Proteinkinase C – unabhängig ist [110], während andere Mechanismen wie die Hypertrophie glatter Muskelzellen über Phospholipase C , einer Änderung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration zur vermehrten Bildung der Protoonkogene c – fos, c – myc und c – jun führt [117], die als Regulationsfaktoren der Transkription gelten. Vor allem die c – fos – Induktion ist von der Protein C – Kinase – Aktivität abhängig [118].

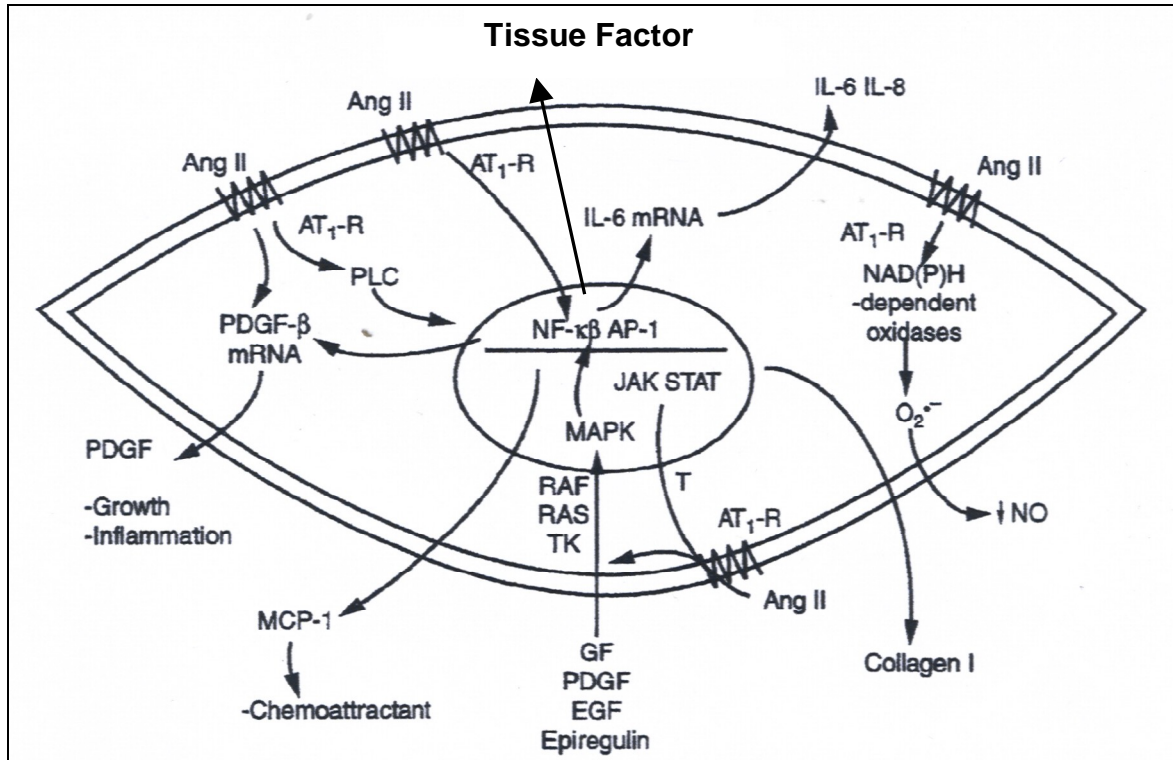
Bei Monozyten ist der Signaltransduktionsmechanismus bis zum Tissue Factor noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass er sich von dem der Endothelzellen und glatten Muskelzellen unterscheidet.

Bei allen Angiotensin II vermittelten Signaltransduktionmechanismen im Rahmen der Arteriosklerose hat sich NF - κB als zentraler Mediator der inflammatorischen

Mechanismen herauskristallisiert [119]. Als Transkriptionsfaktor trägt er wesentlich zur Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen bei [120] und vermittelt oxidativen Stress durch Aktivierung Neutrophiler Granulozyten [121].

Neben NF -  $\kappa$ B stellten Phillips und Kagiya [119] im monozytär / makrophagozytärem RAS noch zwei weitere wichtige AT<sub>1</sub> – gekoppelte Signaltransduktionsmechanismen in den Vordergrund, den über die Nicotinamidadenindinukleotidphosphathydrogenase (NADPH) – Oxidase und den Platelet derived Growth Factor (PDGF). Während sie ersterem vor allem eine Bedeutung für die Angiotensin II Wirkung auf den Fettstoffwechsel und oxidativen Stress einräumten, wurde PDGF eher in den Zusammenhang von Wachstum und Inflammation gebracht. Über NADPH bilden Makrophagen vermehrt Sauerstoffradikale (ROS), die LDL oxidieren. Dieses kann über spezielle Oberflächenrezeptoren aufgenommen werden und führt zu einer Fettakkumulation im Makrophagen. Dieser oxidative Stress ist durch Losartan antagonisierbar [122] und kann durch AT<sub>1</sub> – spezifische Antikörper stimuliert werden, wie kürzlich an glatten Gefäßmuskelzellen mit Antikörpern aus dem Serum präeklantischer Patientinnen gezeigt wurde [123]. In der von den Autoren angeführten Schemazeichnung findet sich bezüglich des oxidativen Stresses keine Beziehung zu NF -  $\kappa$ B. Diesem Signaltransduktionsmechanismus werden hier Wirkungen auf die Interleukin – 6, MCP – 1 und PDGF – Synthese zugewiesen. Zu ergänzen wäre hier auch der Tissue Factor als Mediator von Inflammation und Gerinnung. Diese Trennung der Signaltransduktionswege für den oxidativen Stress und die Synthese inflammatorischer Botenstoffe wurde von Bekay und Coautoren an Neutrophilen Granulozyten bestätigt [121].

**Abbildung 12: Schema der Angiotensin II vermittelten Signaltransduktionsmechanismen von Makrophagen**



Im Mittelpunkt stehen drei Signaltransduktionsmechanismen: PDGF- $\beta$ , NF -  $\kappa$ B und NADPH – Oxidase. Modifiziert nach [119].

Neben den Wirkungen auf phagozytierende Zellen ist an den Endothelzellen vor allem die endotheliale Dysfunktion ein wichtiger therapeutischer Ansatzpunkt bei der ACE – Inhibition. Angiotensin II reduziert die NO – Synthase mRNA und zerstört durch oxidativen Stress NO. Durch Induktion von VCAM – 1 vermittelt es die Anbindung von Monozyten an Endothelzellen, letzteres ist durch Losartan hemmbar [128]. Über Proliferationsreize aktiviert Angiotensin II glatte Gefäßmuskelzellen (via Phospholipase C und NF -  $\kappa$ B) zu Hyperplasie und Proliferation und fördert die Neointimabildung auf ulzerierten arteriosklerotischen Plaques.

Die Komplexität der vaskulären und monozytären Renin – Angiotensin – Systems ist beeindruckend. Die vielfältigen Angiotensin II – Effekte umfassen alle

Zellpopulationen der Gefäßwand. Als reparativer Funktionsapparat entwickelt, der Gefäßläsionen behebt, um Schäden an Organen zu vermeiden, wirkt dieses System bei langandauernden Noxen letztlich selbst schädigend. Unklar bleibt bislang noch der Punkt, an dem die Nachteile dem Benefit des RAS überwiegen. Dies ist der Punkt, an dem eine rationale Therapie einsetzen sollte.

## 5 Zusammenfassung

Meine Ergebnisse zeigen, dass Monozyten, die nicht länger als 48 Stunden in Kultur gehalten und mit Angiotensin II stimuliert werden, eine flüchtige, signifikante Tissue Factor – Synthese aufweisen.

Aufgrund der bisher vorliegenden Erkenntnisse zur Tissue Factor – Expression und Monozytendifferenzierung ist es wahrscheinlich, dass die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen die Ursache dafür darstellt, dass der Effekt bei gering differenzierten Monozyten relativ gering ausfällt. Monozyten verfügen im Gegensatz zu differenzierten Makrophagen nicht über das Angiotensin – Converting – Enzym, noch sind Angiotensin II – Rezeptoren in großen Mengen nachweisbar [80, 124].

Daher ist es unwahrscheinlich, dass periphere Blutmonozyten oder bzw. gering differenzierte Monozyten in Plaques wesentlichen Einfluss auf die lokale und generalisierte Gerinnungsstörung im akuten Myokardinfarkt haben. Dieser Einfluss geht von differenzierten Makrophagen aus, bei denen große Mengen Tissue Factor und alle Bestandteile des RAS gefunden werden.

Die Untersuchungen von Nagata und Coautoren [93] unterstreichen diese besondere Bedeutung von differenzierten Makrophagen und deren Renin – Angiotensin – Systeme für die Arteriosklerose und die damit verbundene Tissue Factor – Synthese. Insbesondere die von diesen Autoren dargestellte Hemmung der Tissue Factor – Bildung durch einen ACE – Inhibitor ist wegweisend für den seit langem bekannten gerinnungshemmenden Effekt dieser Substanzgruppe.

Ob die Wirkungen von Angiotensin II – Rezeptorantagonisten wie Losartan und Candesartan und ACE – Hemmern vergleichbar sind, ist derzeit noch Gegenstand der Diskussion. Erste klinische Studien zu diesem Thema sind jedoch unternommen,

bezüglich der Mortalität konnte in der Elite – Studie zwischen Losartan und Enalapril kein Unterschied festgestellt werden [125, 126]. Soejima und Coautoren publizierten 2001 erste Ergebnisse in bezug auf Fibrinolyse und Gerinnung zu beiden Substanzgruppen als placebokontrollierte, doppelblinde Untersuchung. Kontrolliert wurden Plasminogen Activator Inhibitor (PAI), Tissue Type Plasminogen Activator (t-PA) und Tissue Factor im Plasma von Herzinfarktpatienten über einen Zeitraum von 28 Tagen. Während die initialen Werte aller drei Parameter gegenüber gesunden Probanden erhöht waren, sanken die PAI und Tissue Factor – Level nach Therapie bei beiden Substanzgruppen gleichermaßen, während die t-PA – Werte und die Placebogruppe konstant erhöht blieben [127]. Sollten sich die Veröffentlichungen diesbezüglich verdichten, so stehen mit ACE – Hemmern und AT<sub>1</sub> – Antagonisten gleichermaßen potente antithrombotisch/ antiarteriosklerotisch wirksame Substanzen zur Verfügung.

## 6 Schlusswort und Ausblicke

Die Arteriosklerose und ihre Folgekrankheiten sind Ziel zahlreicher Therapiemodelle, denen prinzipiell vier verschiedene Ansätze zugrunde liegen [128]:

1. Die Plaueinitiierung von der Monozytenmigration in den subendothelialen Raum bis hin zur Ausbildung der Fatty – Streak – Läsion.
2. Die Plaueprogression unter besonderer Betonung der Schaumzellnekrose.
3. Die Plauestabilisierung mit Berücksichtigung der proteolytischen Aktivität der Monozyten.
4. Die Größenreduktion und Rückbildung der Plaques aufgrund der spezifischen Zusammensetzung und der Monozytenaktivität.

Bislang mangelte es an Substanzen mit denen man therapeutischen Einfluss auf diese Mechanismen nehmen konnte. Mit Einführung der ACE – Inhibitoren und Angiotensin II – Rezeptorantagonisten stehen nun potente Medikamente zur Verfügung, deren therapeutische Wirksamkeit bereits in Studien geprüft wird.

Die Angiotensin II – vermittelte, monozytäre/makrophagozytäre Tissue Factor – Expression ist dabei ein Baustein, der zur Arteriosklerose beiträgt und neben dem Fettgehalt wesentlich für die Thrombogenität eines Plaques verantwortlich ist [129].

Eine therapeutische, dauerhafte ACE – Hemmung bzw. selektive Angiotensin II – Blockade erscheint damit über die Hemmung des Tissue Factor – Pathways und daraus resultierender Plauestabilisierung für diese Patienten sinnvoll und hilfreich. Der Einsatz dieser Substanzgruppen ist somit bereits in der Sekundärprävention bei Hochrisikopatienten zu erwägen, bevor Symptome auftreten und irreversible Schäden am Gefäßsystem auftreten [130].

Neben den klinischen und laborchemischen Verlaufsparemtern ist für die Verlaufsbeurteilung der Effizienz solcher Therapiemodalitäten eine Bildgebung zu fordern, die den zum Teil mikroskopischen, arteriosklerotischen Veränderung gerecht wird und somit eine unmittelbare Vergleichsmöglichkeit schafft.

Die Differenzierung aktiver, rupturgefährdeter Läsionen von indurierten, verkalkten Plaques rückt mit der Weiterentwicklung bildgebender Verfahren und dabei insbesondere der Kernspintomographie in den Bereich des Möglichen. Mit der Detektion und Analyse von Frühstadien der Arteriosklerose könnte somit ein stärkeres Gewicht kardiologischen und kardiochirurgischen Handelns auf die Prävention von Hochrisikogruppen gelegt werden. Erste Studien zur Differenzierung von vulnerablen Plaques sind abgeschlossen [131, 132] und eine Untersuchung wurde bereits unternommen, um mit der MRT die Wirkung von Lipidsenkern auf die Plaqueregression und – Morphologie in vivo abzubilden [133].

Auf die besondere Bedeutung des Makrophagenreichtums für das Risiko der Plaqueruptur wurde bereits hingewiesen [134]. Die Darstellung solcher Veränderungen ist kernspintomographisch bereits gelungen [135].

Sollten sich die Befunde bezüglich des prädiktiven Wertes von Tissue Factor für die Plaquethrombogenität weiter erhärten, so wäre ein weiterer diagnostischer Ansatz vorgezeichnet. Mittels Antikörper – gekoppelten Kontrastmitteln wäre somit eine molekulare Bildgebung verwirklichtbar. MIONS, extrem kleine, super – paramagnetische Eisenoxidpartikel, können durch Endothelzwischenräume in den subendothelialen Raum übertreten und dort Makrophagen markieren [135 , 136].

Bislang stellen Ortsauflösung und Signal – Rausch – Verhältnis der meisten MR – Tomographen noch ein Problem dar. Gelingt es diese technischen Probleme zu bewältigen, so ist von einem grundlegenden Wandel in der Bildgebung der Koronargefäße auszugehen. Die Möglichkeit, in vivo die therapeutische Wirksamkeit

von vasoaktiven bzw. antiarteriosklerotischen Substanzen zu zeigen, wird in den nächsten Jahrzehnten eine der großen Herausforderungen an die Bildgebung in Kardiologie und Radiologie sein. Schlagworte wie „Tissue Imaging“, „Monocytal Targeting“ oder „Plaque Mapping“ könnten feststehende Begriffe in der zukünftigen Literatur sein.

## I Literaturverzeichnis

- [1] Silverberg SA, Nemerson Y, Zur M. Kinetics of the activation of bovine coagulation factor X by components of the extrinsic pathway. Kinetic behavior of two-chain factor VII in the presence and absence of tissue factor. *J Biol Chem* 252: 8481-8488, 1977.
- [2] Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. *Circulation* 90: 775-778, 1994.
- [3] Leatham EW, Bath PM, Tooze JA, Camm AJ. Increased monocyte tissue factor expression in coronary disease. *Br Heart J* 73:10-13,1995.
- [4] Mackman N, Sawdey MS, Keeton MR and Loskutoff DJ. Murine tissue factor gene expression in vivo: tissue and cell specificity and regulation by lipopolysaccharide. *Am J Pathol* 143: 76-84, 1993.
- [5] Moore KL, Andreoli, SP, Esmon NL, Esmon CT, Bang NU. Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro. *J Clin Invest* 79: 124-130, 1987.
- [6] Nawroth PP, Stern DM, Kiesel W, Bach R. Cellular requirements for tissue factor generation by bovine aortic endothelial cells in culture. *Thromb Res* 40: 677-691, 1985.
- [7] Brogan GX Jr. Bench to bedside: pathophysiology of acute coronary syndromes and implications for therapy. *Acad Emerg Med* 9: 1029-1044, 2002.
- [8] Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 326: 242-250, 1992.

- [9] Badimon JJ, Lettino M, Toschi V, Fuster V, Berrozpe M, Chesbro JH, Badimon L. Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques. *Circulation* 99: 1780-1787, 1999.
- [10] Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Immunohistochemical detection of human Tissue factor in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 80: II-182, 1989.
- [11] Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular Expression of tissue factor in human tissues. *Am J Pathol* 134: 1087-1097, 1989.
- [12] Moons AH, Levi M, Peters RJ. Tissue factor and coronary artery disease. *Cardiovasc Res* 53: 313-325, 2002.
- [13] Soejima H, Ogawa H, Yasue H, Suefuji H, Kaikita K, Tsuji I, Kumeda K, Aoyama N. Effects of enalapril on tissue factor in patients with uncomplicated acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 78: 336-340, 1996.
- [14] Marmur JD, Thiruvikraman SV, Fyfe BS, Guha A, Sharma SK, Ambrose JA, Fallon JT, Nemerson Y, Taubman MB. Identification of active Tissue Factor in human coronary atheroma. *Circulation* 94: 1226-1232, 1996.
- [15] Drake TA, Ruf W, Morrissey JH, Edgington TS. Functional tissue factor is entirely cell surface expressed on lipopolysaccharide-stimulated human blood monocytes and a constitutively tissue factor-producing neoplastic cell line. *J Cell Biol* 109: 389-395, 1989.
- [16] Ott I, Andrassy M, Ziegler-Schallberger D, Geith S, Schomig A, Neumann FJ. Regulation of monocyte procoagulant activity in acute myocardial infarction: role of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor-1. *Blood* 97: 3721-3726, 2001.
- [17] Cambien F, Poirier O, Lecerf L. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 359: 641-644, 1992.

- [18] Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood: Scand J Clin Invest 21: 77-89, 1968 (suppl 97).
- [19] Hassan NF, Campbell DE, Douglas SD. Purification of human monocytes on gelatin-coated surfaces. J Immunol Meth 95: 273-276, 1986.
- [20] Schiebler TH, Peiper U, Schneider F. Histologie: Lehrbuch Cytologie, Histologie, und mikroskopische Anatomie des Menschen. Springer-Verlag Berlin, 2 Auflage, S270, 1986.
- [21] Löffler H. Unspezifische Esterasefärbung. Blut 15: 330, 1967.
- [22] Herzenberg LA, Sweet RG, Herzenberg LA. Fluorescence-activated cell sorting. Sci Am 234: 108-117, 1976.
- [23] Edwards RL, Perla D. The effect of serum on monocyte tissue factor generation. Blood 64: 707-714, 1984.
- [24] Hölschermann H, Dürfeld F, Maus U, Bierhaus A, Heidinger K, Lohmeier J, Nawroth PP, Tillmanns H, Haberbosch W. Cyclosporin A inhibits tissue factor expression in monocytes/macrophages. Blood 88: 3837-3845, 1996.
- [25] Helin H, Edgington TS. Allogenic induction of the human T cell instructed monocyte procoagulant response is rapid and is elicited by HLA-DR. J Exp Med 158: 962-975, 1983.
- [26] Tanaka S, Iwanaga S. Limulus Test for detecting bacterial endotoxins. Meth Enzymol 223: 358-364, 1993.
- [27] Kisiel W, McMullen BA. Isolation and characterization of human Factor VIIa. Thromb Res 22: 375-380, 1981.
- [28] Aurell L, Friberger P, Karlsson G, Claeson G. A new sensitive and highly specific chromogenic peptide substrate for Factor Xa. Thromb Res 11: 595-609, 1977.
- [29] Vinazzer H. Assay of Factor Xa with a chromogenic substrate. New methods for the analysis of coagulation using chromogenic substrates. I Wiff. (Ed.) de Gruyter, Berlin, S203-210, 1977.

- [30] Odegard OR, Lie M, Abildgaard U. Antifactor Xa activity measured with amidolytic methods. *Haemostasis* 5: 265-275, 1976.
- [31] Teien AN, Lie M, Abildgaard U. Assay of heparin in plasma using a chromogenic substrate for activated Factor X. *Thromb. Res* 8: 413-416, 1976.
- [32] Carson SD. Continuous chromogenic tissue factor assay: comparison to clot-based assays and sensitivity established using pure tissue factor. *Thromb Res* 47: 379-387, 1987.
- [33] Chomczynski P, Sacchi N: Single step method of RNA-isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156, 1987.
- [34] Brown TA. Die Polymerasekettenreaktion. In: Brown TA. *Gentechnologie für Einsteiger*. Spektrum Verlag, Heidelberg, S235-275, 1995.
- [35] Hahn AW, Jonas U, Bühler FR, Resink TJ. Activation of human peripheral monocytes by angiotensin II. *FEBS Letters* 347: 178-180, 1995.
- [36] Scarpati EM, Wen D, Broze G, Miletich JP, Flandermayer RR, Siegel NR, Sadler E. Human tissue factor: c-DNA-sequence and chromosome localization of the gene. *Biochemistry* 26: 5234, 1987.
- [37] Maher M, Dowdall D, Glennon M, Walshe S, Cormican M, Wiesner P, Gannon F, Smith T. The sensitive detection of fluorescently labeled PCR products using an automated detection system. *Mol Cell Prob* 9: 265-276, 1995.
- [38] WHO Monica Project. Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA Project. *Circulation* 90: 583-612, 1994.
- [39] Davies M, Thomas A. Plaque fissuring – the cause of acute myocardial infarction, sudden ischemic death and crescendo angina. *Br Heart J* 53: 173-177, 1985.

- [40] Alexander RW. Hypertension and pathogenesis of atherosclerosis: oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response. *Hypertension* 25: 155-161, 1995.
- [41] Gysan DB. : Primäre und sekundäre Prävention der Arteriosklerose - Stellenwert der arteriellen Hypertonie. *Z Kardiologie* 91: 777-785, 2002.
- [42] Nemerson Y. The Tissue Factor pathway of blood coagulation. *Semin Hematol* 29:170-176, 1992.
- [43] Ardissino D, Merlini PA, Ariens R, Coppola R, Bramucci E, Mannucci PM. Tissue-factor antigen and activity in human coronary atherosclerotic plaques. *Lancet* 349: 769-771, 1997.
- [44] Ardissino D, Merlini PA, Arlens R, Coppola R, Bramucci E, Lucreziotti S, Repetto A, Fetiveau R, Mannucci PM. Tissue factor in human coronary atherosclerotic plaques. *Clin Chim Acta* 291: 235-40, 2000.
- [45] Himer J, Kling D, Fallon JT, Nemerson Y, Riederer MA. In situ localization of tissue factor in human thrombi. *Blood* 99: 4249-4250, 2002.
- [46] Widdershoven JWVG, Gorgels APM, Vermeer F, Dijkman WN, Verstraaten GMP, Dassen WRM, Wellens HJ. Changing characteristics and in-hospital outcome in patients admitted with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 18: 1073-1080, 1997.
- [47] de Vrede QJM, Gorgels APM, Verstraaten MP, Vermeer F, Dassen WRM, Wellens NJJ. Did prognosis after acute myocardial infarction change during the past 30 years? A metaanalysis. *J Am Coll Cardiol* 18: 689-706, 1991.
- [48] Multicenter Postinfarction Research Group. Risk stratification after acute myocardial infarction. *N Eng J Med* 309: 331-336, 1983.

- [49] ISIS-2 Collaborative Group. Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17187 cases of suspected myocardial infarction. *Lancet* 2: 349-360, 1988.
- [50] ISIS-4 Collaborative Group. ISIS-4: A randomised factorial trial assessing early oral captopril, oral mononitrate, and intravenous magnesium sulphate in 58050 patients with suspected acute myocardial infarction. *Lancet* 345: 669-685, 1995.
- [51] Beta-Blocker Heart Attack Trial (BHAT). A randomized trial of propranolol in patients with acute myocardial infarction. I. Mortality results. *J Am Med Ass* 247: 1707-1714, 1982.
- [52] Kjekhus J, Pedersen TR. Reducing the risk of coronary events: Evidence of the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Am J Cardiol* 76: 64-68, 1995.
- [53] Maynard JR, Heckman CA, Pitlick FA, Nemerson Y. Association of tissue factor activity with the surface of cultured cells. *J Clin Invest* 55: 814-824, 1975.
- [54] Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: Basic mechanisms. Oxidation, inflammation and genetics. *Circulation* 91: 2488-2496, 1995.
- [55] Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2839-2843, 1989.
- [56] Glasgow S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolletis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 316: 1371-75, 1987.
- [57] Rice Evans C, Leake D, Bruckdorfer KR, Diplock AT. Practical approaches to low density lipoprotein oxidation: whys, wherefores and pitfalls. *Free Radical Res* 25: 285-311, 1996.

- [58] Scheidegger KJ, Butler S, Witzum JL. Angiotensin II increases macrophage – mediated modification of low density lipoprotein via a lipooxygenase – dependent pathway. *J Biol Chem* 272: 21609-21615, 1997.
- [59] Yanagitani Y, Rakugi H, Okamura A, Moriguchi K, Takiuchi S, Ohishi M, Suzuki K, Higaki J, Ogihara T. Angiotensin II type 1 receptor-mediated peroxide production in human macrophages. *Hypertension* 33(1 Pt 2):335-339,1999.
- [60] Keidar S, Kaplan M, Shapira C, Brook JG, Aviram M. Low density lipoprotein isolated from patients with essential hypertension exhibits increased propensity for oxidation and enhanced uptake by macrophages: a possible role for angiotensin II. *Atherosclerosis* 107: 71-84, 1994.
- [61] Lloyd-Jones DM, Camargo CA Jr, Giugliano RP, O'Donnell CJ. Effect of leukocytosis at initial examination on prognosis in patients with primary unstable angina. *Am Heart J* 139: 867-873, 2000.
- [62] Sambola A, Osende J, Hathcock J, Degen M, Nemerson Y, Fuster V, Crandall J, Badimon JJ. Role of risk factors in the modulation of tissue factor activity and blood thrombogenicity. *Circulation* 107: 973-7, 2003.
- [63] Napoleone E, Di Santo A, Camera M, Tremoli E, Lorenzet R. Angiotensin – Converting enzyme inhibitors downregulate tissue factor synthesis in monocytes. *Circ Res* 86:139-143, 2000.
- [64] Dzau VJ. Circulating versus local renin angiotensin systems in cardiovascular homeostasis. *Circulation* 77 [suppl I]: I4-I13, 1988.
- [65] Lindmark E, Siegbahn A. Tissue factor regulation and cytokine expression in monocyte-endothelial cell co-cultures. Effects of a statin, an ACE-inhibitor and a low-molecular-weight heparin. *Thromb Res* 108: 77-84, 2002.

- [66] Diet F, Pratt RE, Berry GJ, Momose N, Gibbons GH, Dzau VJ. Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circulation* 94: 2756-2767, 1996.
- [67] Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M, Nussberger J, Harringer W, Drexler H. Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques : potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation* 96 : 1372-1378, 2000.
- [68] Potter DD, Sobey CG, Tomkins PK, Rossen JD, Heistad DD. Evidence that macrophages in atherosclerotic lesions contain angiotensin II. *Circulation* 98: 800-807, 1998.
- [69] Kofir I, Dzau VJ. Endothelial renin- angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensins. *Circ Res* 60: 422-428, 1987.
- [70] Naftilan AJ, Zuo WM, Ingelfinger JR, Ryan T, Pratt T, Dzau VJ. Localization and differential regulation of angiotensinogen mRNA in the vessel wall. *J Clin Invest* 87: 1300-1311, 1991.
- [71] Eggena P, Krall F, Eggena MP, Clegg K, Fittingoff M, Barrett JD. Production of angiotensinogen by cultured rat aortic smooth muscle cells. *Clin Exper Hyper Theory Prac A* 12: 1175-1189, 1990.
- [72] RE R, Fallon JT, Dzau VJ, Quay SC, Haber S. Renin synthesis by canine aortic smooth muscle cells in culture. *Life Sci* 30: 99-106, 1982.
- [73] Samani NJ, Swales JD, Brammar WJ. Expression of renin gene in extra-renal tissues of the rat. *Biochem J* 253: 907-910, 1988.
- [74] Caldwell PRB, Seegal BC, Hsu KC, Das M, Soffer RL. Angiotensin converting enzyme: vascular endothelial localization. *Science* 191: 1050-1051, 1976.
- [75] Velettri P, Bean BL. The effects of captopril on rat aortic angiotensin – converting enzyme. *J Cardiovasc Pharmacol* 4: 315-325, 1982.

- [76] Gohlke P, Unger Th, Bünning P. Distribution of the angiotensin converting enzyme inhibitor ramiprilat in the blood vessel wall. *Pharm Pharmacol Lett* 2:66-69, 1992.
- [77] Gohlke P, Bünning P, Unger Th. Distribution and metabolism of angiotensin I and II in the blood vessel wall. *Hypertension* 20: 151-157, 1992.
- [78] Ryan US, Ryan JW, Whitaker C, Chiu A. Localization of angiotensin converting enzyme (kininase II). II. Immunocytochemistry and immunofluorescence. *Tissue Cell*. 8 : 125-146, 1976.
- [79] Suzuki H, Shibata H, Murakami M, Sato A, Naito M, Ichichara A , Matsumoto A, Tsujimoto G, Hirasawa A, Horie K. Modulation of angiotensin II type 1 receptor mRNA expression in human blood cells: comparison of platelets and mononuclear leukocytes. *Endocr J* 42: 15-22, 1995.
- [80] Okamura A, Rakugi H, Ohishi M, Yanagitani Y, Takiuchi S, Moriguchi K, Fennessy PA, Higaki J, Ogihara T. Upregulation of the renin-angiotensin-system during differentiation of monocytes to macrophages. *J Hypertens* 17: 537-545, 1999.
- [81] Friedland J, Setton C, Silverstein E. Induction of angiotensin conducting enzyme in human monocytes in culture. *Biochem Biophys Res Comm* 83: 843, 1978.
- [82] Rohrbach MS, Conrad AK. Comparison of the T-lymphocyte-dependent induction of angiotensin-converting enzyme and leucine aminopeptidase in cultured human monocytes. *Clin Exp Immunol* 83: 510-515, 1991.
- [83] Geisterfer AAT, Peach MJ, Owens GK. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 62, 749-756, 1988.
- [84] Griffin SA, Brown WCB, MacPherson F. Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension* 17: 626-635, 1991.
- [85] Campbell-Boswell M, Robertson AL. Effects on angiotensin II and vasopressin on human smooth muscle cells in vitro. *Exp Mol Pathol* 35: 265-276, 1981.

- [86] Kawahara Y, Sunako M, Tsuda T, Fukuzaki H, Fukumoto Y, Takai Y. Angiotensin II induces expression of the c-fos gene through protein kinase C activation and calcium ion mobilization in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 150: 52-59, 1988.
- [87] Lachurie ML, Azizi M, Guyene TT, Alhenc-Gelas F, Menard J. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism has no influence on the circulating renin-angiotensin-aldosterone system or blood pressure in normotensive subjects. *Circulation* 91: 2933-2942, 1995.
- [88] Di Pasquale P, Cannizzaro S, Longo AM, Maringhini G, Iachininoto R, Paterna S. Captopril plus losartan in early post-infarction. Neurohormonal effects: a pilot study. *G Ital Cardiol* 27: 1256-1263, 1997.
- [89] Mervaala EMA, Müller DN, Park JK, Schmidt F, Löhn M, Breu V, Dragun D, Ganten D, Haller H, Luft FC. Monocyte infiltration and adhesion molecules in a rat model of high human renin hypertension. *Hypertension* 33[part II]: 389-395, 1999.
- [90] Müller DN, Mervaala EMA, Dechend R, Fiebeler A, Park JK, Schmidt F, Theuer J, Breu V, Mackman N, Luther T, Schneider W, Gulba D, Ganten D, Haller H, Luft FC. Angiotensin II (AT(1)) receptor blockade reduces vascular tissue factor in angiotensin II-induced cardiac vasculopathy. *Am J Pathol* 157: 111-122, 2000.
- [91] Nishimura H, Tsuji H, Masadu H, Nakagawa K, Nakahara Y, Kitamura H, Kasahara T, Sugano T, Yoshizumi M, Sawada S, Nakagawa M. Angiotensin II increases plasminogen activator inhibitor-1 and tissue factor mRNA expression without changing that of tissue type plasminogen activator or tissue factor pathway inhibitor in cultured rat aortic endothelial cells. *Thromb Haemost* 77: 1189-1195, 1997.

- [92] Taubman MB, Marmur JD, Rosenfield CL, Guha A, Nichtberger S, Nemerson Y: Agonist-mediated tissue factor expression in cultured vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 91: 547-52, 1993.
- [93] Nagata K, Ishibashi T, Sakamoto T, Nakazato K, Seino Y, Yokoyama K, Ohkawara H, Teramoto T, Maruyama Y. Effects of blockade of the renin-angiotensin system on tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 synthesis in human cultured monocytes. *J Hypertens* 19: 775-783, 2001.
- [94] Mackman N, Morrisey JH, Fowler B, Edgington TS. Complete sequence of the human tissue factor gene, a highly regulated cellular receptor that initiates the coagulation protease cascade. *Biochemistry* 28: 1755-1762, 1989.
- [95] Conway EM, Bach R, Rosenberg RD, Konigsberg WH. Tumor necrosis factor enhances expression of tissue factor mRNA in endothelial cells. *Thromb Res* 53: 231-241, 1989.
- [96] Scarpati EM, Sadler JE. Regulation of endothelial cell coagulant properties. *J Biol Chem* 264: 20705-20713, 1989.
- [97] Morissey JH, Fakhrai H, Edgington TS. Molecular cloning of the human tissue factor gene, a highly regulated cellular receptor that initiates the coagulation protease cascade. *Biochemistry* 229: 991-993, 1989.
- [98] Spicer, EK, Horton R, Bloem L, Bach R, Williams KR, Guha A, Kraus J, Lin TC, Nemerson Y, Konigsberg WH. Isolation of cDNA clones coding for human tissue factor: Primary structure of the protein and cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5148-5152, 1987.
- [99] Crossman DC, Carr DP, Tuddenham EGD, Pearson JD, McVey JH: The regulation of Tissue Factor mRNA in human endothelial cells in response to endotoxin or phorbol ester. *J Biol Chem* 265: 9782-9787, 1990.

- [100] Brand K, Fowler BJ, Edgington TS, Mackman N. Tissue Factor mRNA levels in THP-1 monocytic cells are regulated by both transcriptional and post-transcriptional control mechanisms. *Mol Cell Biol* 11: 4732-4738, 1991.
- [101] Edgington TS, Mackman N, Brand K, Ruf W. The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb Haemost* 66: 67-79, 1991.
- [102] Ruf W, Edgington TS. Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo. *FASEB J* 8: 385-390, 1994.
- [103] Harlos K, Martin DMA, O'Brien DP, Jones EY, Stuart DI, Polikarpov I, Miller A, Tuddenham EGD, Boys CWG. Crystal structure of the extracellular region of human tissue factor. *Nature* 370: 662-666, 1994.
- [104] Nemerson Y. Tissue Factor and hemostasis. *Blood* 71: 1-8, 1988.
- [105] Osterud B, Rapaport SI. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5260-5264, 1977.
- [106] Van den Eijnden MM, Steenhauer SI, Reitsma PH, Bertina RM. Tissue Factor expression during monocyte-macrophage-differentiation. *Thromb Haemost* 77: 1129-1136, 1997.
- [107] Sueishi K, Ichikawa K, Nakagawa K, Kato K, Elsayed YA, Namoto M. Procoagulant properties of atherosclerotic aortas. *Ann N Y Acad Sci* 748: 185-93, 1995.
- [108] Kato K, Elsayed YA, Namoto M, Nagakawa K, Sueishi K. Enhanced expression of tissue factor activity in the atherosclerotic aortas of cholesterol-fed rabbits. *Thromb Res* 82: 335-347, 1996.
- [109] Hernandez-Presa M, Bustos C, Ortego M, Tunon J, Renedo G, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor- $\kappa$ B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage

infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation* 95: 1532-1541, 1997.

[110] Maynard JR, Dreyer ME, Stemerman MB, Pitlick FA. Tissue-Factor coagulant activity of cultured human endothelial and smooth muscle cells and fibroblasts. *Blood* 50: 387-396, 1977.

[111] Van der Waal AC, Becker AE, Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective to the predominant plaque morphology. *Circulation* 89: 34-44, 1994.

[112] Shebuski RJ, Kilgore KS. Role of inflammatory mediators in thrombogenesis. *J Pharmacol Exp Ther* 300: 729-735, 2002.

[113] Ehrlich JH, Boyle EM, Labriola J, Kovacich JC, Santucci RA, Fearn C, Morgan E, Yun W, Luther T, Kojikawa O, Martin TR, Pohlman TH, Verrier ED, Mackman N. Inhibition of the Tissue Factor – Thrombin Pathway limits infarct size after myocardial ischemia reperfusion injury by reducing inflammation. *Am J Pathol* 157: 1849-1862, 2000.

[114] Kim HK, Song KS, Park YS, Yun YS, Shim WH. Changes of plasma tissue factor pathway inhibitor antigen levels and induction of tissue factor expression on the monocytes in coronary artery disease. *Cardiology* 93: 31-36, 2000.

[115] Ernsberger P, Zhou J, Damon TH, Douglas JG. Angiotensin II receptor subtypes in cultured rat renal mesangial cells. *Am J Physiol* 263: F411-F416, 1992.

[116] Molloy CJ, Taylor DS, Weber H. Angiotensin II stimulation of rapid protein tyrosine phosphorylation and protein kinase activation in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 268: 7338-7345, 1993.

- [117] Dzau VJ. Lokale Expression und pathophysiologische Rolle von Renin-Angiotensin im Gefäßsystem und im Herzen. In: H Grobecker, G. Heusch, B.E. Strauer. Angiotensin und Herz. Steinkopff-Verlag, Darmstadt, S1-15, 1993.
- [118] Taubman MB, Berk BC, Izumo S, Tsuda T, Alexander RW, Nadal-Ginard B. Angiotensin II induces c-fos mRNA in aortic smooth muscle. J Biol Chem 264: 526-530, 1989.
- [119] Phillips MI, Kagiyama S. Angiotensin II as a pro – inflammatory mediator. Curr Opin Invest Drugs 3: 569-577, 2002.
- [120] Zahradka P, Werner JP, Buhay S, Litchie B, Helwer B, Thomas S. NF -  $\kappa$ B activation is essential for angiotensin II – dependent proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. J Moll Cell Cardiol 34: 1609-1621, 2003.
- [121] El Bekay R, Alvarez M, Alba G, Chacon P, Vega A, Martin-Nieto J, Jimenez J, Monteseirin J, Pintado E, Bedoya FJ, Sobrino F. Oxidative stress is a critical mediator of the angiotensin II signal in human neutrophils: involvement of map kinases, calcineurin, and the transcription factor NF- $\kappa$ B. Blood [epub ahead of print], 2003.
- [122] Keidar S, Kaplan M, Hoffmann A, Aviram M. Angiotensin II stimulates macrophage – mediated oxidation of low density lipoproteins. Atherosclerosis 115: 201-215, 1995.
- [123] Dechend R, Viedt C, Mueller DN, Ugele B, Brandes RP, Wallukat G, Park JK, Janke J, Barta P, Theuer J, Fiebeler A, Homuth V, Dietz R, Haller H, Kreuzer J, Luft F. AT<sub>1</sub> – receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients stimulate NADPH oxidase. Circulation 107: 1632-1639, 2003.
- [124] Friedland J, Setton C, Silverstein E. Induction of angiotensin conducting enzyme in human monocytes in culture. Biochem Biophys. Res Comm 83: 843, 1978.

- [125] Houghton AR, Harrison M, Cowley AJ. Haemodynamic, neurohumoral and exercise effects of losartan vs. captopril in chronic heart failure: results of an ELITE trial substudy. *Evaluation of Losartan in the Elderly. Eur J Heart Fail* 1: 385-393, 1999.
- [126] Pitt B, Poole-Wilson P, Segal R, Martinez FA, Dickstein K, Camm AJ, Konstam MA, Riegger G, Klingler GH, Neaton J, Sharma D, Thiyagarajan B. Effects of losartan versus captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: rationale, design, and baseline characteristics of patients in the Losartan Heart Failure Survival Study--ELITE II. *J Card Fail* 5: 146-154, 1999.
- [127] Soejima H, Ogawa H, Suefuji H, Kaikita K, Takazoe K, Miyamoto S, Kajiwara I, Shimomura H, Sakamoto T, Yoshimura M, Nakamura S. Comparison of effects of losartan versus enalapril on fibrinolysis and coagulation in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 87: 1408-1411, 2001.
- [128] Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA, Kelley JL, Cayatte AJ, Mowery J. Artherosclerosis. Potential targets for stabilization and regression. *Circulation* 86 (Suppl III): III-117-III-123, 1992.
- [129] Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz SD, Fernández-Ortiz A, Chesebro JH, Badimon L, Nemerson Y, Fuster V, Badimon JJ. Tissue Factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 95: 594-599, 1997.
- [130] Larose E, Tardif JC, Bourassa MG. Use of ACE Inhibitors for secondary prevention. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 5: 51-61, 2003.
- [131] Hatsukami TS, Ross R, Polissar NL, Yuan C. Visualization of fibrous cap thickness and rupture in human atherosclerotic carotid plaque in vivo with high-resolution magnetic resonance imaging. *Circulation* 102: 959-964, 2000.

- [132] Mitsumori LM, Hatsukami TS, Ferguson MS, Kerwin WS, Cai J, Yuan C. In vivo accuracy of multisequence MR imaging for identifying unstable fibrous caps in advanced human carotid plaques. *J Magn Reson Imaging* 17: 410-420, 2003.
- [133] Zhao XQ, Yuan C, Hatsukami TS, Frechette EH, Kang XJ, Maravilla KR, Brown BG. Effects of prolonged intensive lipid-lowering therapy on the characteristics of carotid atherosclerotic plaques in vivo by MRI: a case-control study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1623-1629, 2001.
- [134] Fuster V, Badimon JJ, Chesebro JH, Fallon JT. Plaque rupture, thrombosis and therapeutic implications. *Haemostasis* 26 (Suppl 4): 269-284, 1996.
- [135] Weissleder R, Lee AS, Khaw BA, Shen T, Brady TJ. Antimyosin-labeled monocrystalline iron oxide allows detection of myocardial infarct: MR antibody imaging. *Radiology* 182: 381-385, 1992.
- [136] Kooi ME, Cappendijk VC, Cleutjens KB, Kessels AG, Kitslaar PJ, Borgers M, Frederik PM, Daemen MJ, Van Engelshoven JM. Accumulation of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in human atherosclerotic plaques can be detected by in vivo magnetic resonance imaging. *Circulation* [epub ahead of print] 2003.

## II Abkürzungsverzeichnis

μl	mikroliter
ACE	Angiotensin – Converting – Enzym
Ang II	Angiotensin II
AT	Angiotensin
BSA	Bovines Serumalbumin.
C	Konzentration
CAGE	chymostatinsensitiven – Angiotensin II – bildende – Enzyms
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
DTT	dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FACS	Fluoreszenz – aktivierte – zellseparierende – Analyse
Fxa	Faktor Xa
h	Stunden
HBSS	Hanks balanced Salts
HEPES	(4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
Kbp	Kilobasenpaare
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
LDL	Low density lipoprotein
Los	Losartan
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	Monocyte – Chemoattractant – Protein – 1
M-CSF	Monocyte – Stimulating – Factor
M <sub>G</sub>	Molekulargewicht
MIONS	Monocrystalline iron oxide nanoparticles
ml	Milliliter

MO	Monozyten
M-SFM	Makrophagen serumfreiem Medium
mU	Milliunits
MW ( $\mu$ )	Mittelwert
n	Stichprobenumfang
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphathydrogenase
nm	nanometer
NO	Stickoxid
p	Wahrscheinlichkeit
PBS	Dulbecco's Phosphate buffered Salts
PCA	Prokoagulatorische Aktivität
PCR	Polymerase – Kettenreaktion
PDGF	Platelet – derived – growth – Factor
PMB	periphere mononukleäre Blutzellen
pNA	p-Nitroanilide
RAS	Renin – Angiotensin – System
RNA	Ribonukleinsäuren
ROS	Sauerstoffradikale
rpm	rad pro Meter
rt-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SA (s)	Standardabweichung
t	Zeit
TEA	Tris-, EDTA-, Eisacid (=99% Essigsäure)
TF	Tissue Factor
UV	Ultraviolett

## III Anhang

### III.1 Ein- und Ausschlusskriterien für eine Blutspende.

- Eine aktuelle Erkrankung oder ärztliche Behandlung,
- Durchfallerkrankungen in den vorangegangenen 3 Wochen,
- fieberhafte Infektionen in den vorangegangenen 4 Wochen,
- Operationen in den letzten 6 Monaten,
- Zahnbehandlungen in der letzten Woche,
- offene Hautwunden oder Abszesse,
- Medikamenteneinnahme,
- frische Tätowierungen und Piercings,
- Behandlung mit Wachstumshormonen,
- Kornea- oder Duramater-Transplantationen, Blut- oder Plasmatransfusionen 4 Wochen vor Spendetermin
- Kontakt mit Personen, die an einer Infektionskrankheit (z.B. Röteln, Masern, Windpocken) litten,
- Impfungen in den letzten 4 Wochen,
- Gelbsucht, Intimkontakt mit Gelbsucht- oder Hepatitiskranken in den letzten 6 Monaten,
- HIV-Infektionsgefährdung,
- Malariaexposition oder -prophylaxe in den letzten 12 Monaten,
- Zeckenbisse in den letzten 4 Wochen,
- Unverträglichkeit bisheriger Blutspenden,
- Tuberkulose oder feuchte Rippenfellentzündung,
- Brucellosen, Salmonellosen, Rickettsiosen, Babesiose,
- Chagaskrankheit, Schlafkrankheit, Leishmaniasis,

- Geschlechtskrankheiten,
- Creutzfeld-Jacobsche Krankheit,
- Hauterkrankungen,
- Blut- oder Knochenmarkerkrankungen,
- Thrombose oder Gerinnungsstörungen,
- Diabetes mellitus,
- Nierenleiden,
- Schilddrüsenerkrankungen,
- bösartige Erkrankungen,
- Gehirnerschütterungen, Bewusstlosigkeit oder Hirnverletzungen,
- Bluthochdruck, Kreislaufbeschwerden,
- Bronchialasthma,
- Nerven- oder Geisteskrankheiten (Epilepsie, Multiple Sklerose, Migräne etc.),  
psychiatrische Behandlung,
- Alkoholabhängigkeit und bei
- Frauen aktuelle Schwangerschaft, Fehlgeburt oder Schwangerschaftsabbruch  
in den letzten 6 Monaten.

## III.2 Materialverzeichnis

### Laborgeräte und Messinstrumente

- Biometra® - BioDoc II – Transilluminator, Deutschland
- Eisschrank -80°C, Sepatech, Heraeus®, -20°C, Bosch, Deutschland
- Eppendorfhütchen, Safe-Lock, 0,5ml, Eppendorf-Netheler-Hinz®, Hamburg, Deutschland, Art. 0030121.023
- FACS Scan, Becton Dickinson®, New Jersey, USA
- Feinwaage, Typ GT480, Ohaus®, Florham Park, HJ, USA
- Neubauer-Zählkammer, Typ Superior, Deutschland
- PcR-Gerät, Biometra® Tria Thermoblock, Deutschland
- Pipetten, Serological Pipette, 10 ml, steril, nonpyrogenic, Falcon/ Becton Dickinson Labware®, Franklin Lakes, NJ, USA, Art. 357751
- Pipetten, Serological Pipette, 25 ml, steril, nonpyrogenic, Falcon/ Becton Dickinson Labware®, Franklin Lakes, NJ, USA, Art. 357525
- Pipettenspitzen, Standardtips 1000µl, Greiner®, Art.: 656290
- Pipettenspitzen, Standardtips 20µl, Eppendorf-Netheler-Hinz®, Hamburg, Deutschland, Art. 0030001.168
- Pipettierhilfe, Pipetus-Standard, Hirschmann Laborgeräte®, Eberstadt, Deutschland
- Pipettierhilfen, 100µl und 1000µl, Eppendorf-Netheler-Hinz®, Hamburg, Deutschland
- Plattenphotometer, Lab. Instruments GmbH®, Salzburg, Österreich
- Scanner Epson GT-9500
- Scanpack 3.0, Biometra®, Göttingen, Deutschland

- Schüttler für Mikrotiterplatten , Typ Titramax 100, Heidolph<sup>®</sup>, Deutschland
- Vortex, Typ RFAX 1DR, Heidolph<sup>®</sup>, Deutschland
- Wasserbad Typ MD, Julabo<sup>®</sup>, Seelbach, Deutschland
- Zentrifuge 5415 C, Eppendorf<sup>®</sup>, Köln, Deutschland
- Zentrifuge 5417 R, Eppendorf<sup>®</sup>, Köln, Deutschland

## **Monozytenisolierung**

### **Geräte und Instrumente**

- Brutschrank, Heraeus Instruments<sup>®</sup>, Hanau, Deutschland
- Eisschrank -80°C, Sepatech, Heraeus<sup>®</sup>, Hanau, Deutschland
- Megafuge 2.0 R, Heraeus Instruments<sup>®</sup>, Hanau, Deutschland (Rotor 15,5 cm)
- Mikroskop, Typ DM/L, Leica<sup>®</sup>, Wetzlar, Deutschland
- Sterilbank, Laminair HB2472, Heraeus Instruments<sup>®</sup>, Hanau, Deutschland
- Trockenofen, Memmert<sup>®</sup>, Deutschland
- Vortex, Typ VF2, Janke & Kunkel IKA-Labortechnik<sup>®</sup>, Deutschland

### **Plastik und Verbrauchsmaterialien**

- 50 ml Perfusorspritzen, Dispomed Witt<sup>®</sup>, Gelnhausen, Deutschland, Art.21051
- Buffy Coats (engl. buff lederfarben, coat Überzug): Schicht aus Leukozyten und Thrombozyten zwischen Plasma und sedimentierten Erythrozyten nach Zentrifugation ungerinnbaren Blutes<sup>1</sup> in 150 ml Compoflex Beuteln, Firma Biotrans GmbH<sup>®</sup>
- Compoflex Beutel, Firma Biotrans GmbH<sup>®</sup>, Deutschland, Art. T2428 mit 327 mg Zitronensäuremonohydrat, 2,63g Natriumzitat, 251mg

---

<sup>1</sup> Buffy Coats werden aus Blutspenden gewonnen. Die Blutspendebeutel enthalten: 63 ml CPD-Stabilisator nach DAB, 26,3 g Natriumcitratdihydrat, 3,27 g Citronensäure-Monohydrat, 25,5 g Glukosemonohydrat, 2,51 g Natriumhydrogenphosphatdihydrat, 1000 ml Aqua ad injectabile.

Natriumdihydrogenmonophosphat, 2,55g Dextrosemonohydrat und 100 ml  
Aqua ad injectabile

- Gewebekulturflaschen 250 ml mit kontaminationssicherem Verschluss, Greiner<sup>®</sup>, Frickenhausen, Deutschland, Art. 658175
- Makroplatten Cellstar 6 Loch steril, Greiner<sup>®</sup>, Frickenhausen, Deutschland, Art. 657160
- Mikroplatten Cellstar 96 Loch steril, Greiner<sup>®</sup>, Frickenhausen, Deutschland, Art. 655180
- Millex-GS-Filter, Non-Pyrogenic, steril, 0,22 µm, Millipore<sup>®</sup>, Molsheim, Frankreich, Art. SLGS 025BS
- Pipettenspitzen, steril, verschiedene Größen, Greiner<sup>®</sup>, Frickenhausen
- Polypropylen-Röhrchen, Cellstar<sup>™</sup>, steril, 15 ml, Greiner<sup>®</sup>, Frickenhausen, Deutschland, Art. 188.271
- Polypropylen-Röhrchen, Cellstar<sup>™</sup>, steril, 50 ml, Greiner<sup>®</sup>, Frickenhausen, Deutschland, Art. 227.261
- Verschlusskonus (Combi rot), steril, Braun<sup>®</sup>, Melsungen, Deutschland, Art. 04495101

#### **Gebrauchslösungen, Chemikalien**

- Amphotericin B, 100ml (250µg/ml), Sigma<sup>®</sup>, Deisenhofen, Deutschland, Art. 172942
- Aqua ad injectabile, 1000 ml, Baxter<sup>®</sup>, Unterschleißheim, Deutschland, Art. SN881514
- Ficoll-Paque Research Grade, Amersham Pharmacia Biotech AB<sup>®</sup>, Upsalla, Schweden, Art. 17-0840-03

- Gelatine Type A from Porcine Skin, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Steinheim, Deutschland, Art. G6144
- HBSS 1x 2000 ml (Hanks balanced Salts ohne Calcium, Magnesium und Phenolrot) PAA<sup>®</sup>, Linz, Österreich, Art. H22-009
- Makrophagen serumfreies Medium, 1x (M-SFM), Gibco BRL<sup>®</sup>, Eggenstein, Deutschland, Art. 12-065-074
- PBS 1x 500 ml (Dulbecco`s Phosphate buffered Salts ohne Calcium, Magnesium und Phenolrot) PAA<sup>®</sup>, Linz, Österreich, Art. H15-002
- Penicillin/Streptomycin Lösung, 100ml (10.000U/ml), Gibco BRL<sup>®</sup>, Eggenstein, Deutschland, Art. 15140-114
- Trypanblau, 25g, Fluka Chemie AG<sup>®</sup>, Buchs, Deutschland, Art. 93590

### **Zellkultur**

- Angiotensin II, synthetisch, human, Sigma<sup>®</sup>, Deisenhofen, Deutschland, Art. A9525
- Losartan – Reinsubstanz, weißes Pulver, 5 mg, MSD Sharp & Dohme<sup>®</sup>, Haar, Deutschland, Art. DuP753
- LPS, Escherichia coli 0111:B4, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Steinheim, Deutschland, Art. L-2630

### **PCA**

- Calciumchlorid, 100 ml (0,025 mol/l), Behring<sup>®</sup>, Marburg, Deutschland, Art. 506855
- Factor-VII-Mangelplasma monospezifische Antikörper gegen menschlichen Tissue Factor, American Diagnostica Inc<sup>®</sup>, Greenwich, CT, USA
- Kaninchenhirn-Thromboplastinaufbereitung (Sigma)

- Reagenzröhrchen, 4 ml, Greiner<sup>®</sup>, Frickenhausen, Deutschland, onA
- Rührspatel, Sarstedt<sup>®</sup>, Deutschland, onA
- Seromed EDTA Versen 1% in PBS ohne Calcium, Magnesium, Biochrom AG<sup>®</sup>, Berlin, Deutschland, Art. L2113
- Standardhumanplasma, Dade Behring<sup>®</sup>, Marburg, Deutschland, Art. 502557

### **Tissue Factor Assay**

- Assay-Puffer:
  - CaCl 5 mM, Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Deutschland
  - NaCl, Natriumchlorid, 1kg, Roth<sup>®</sup>, Karlsruhe, Deutschland, Art. 3957.1, 140 mM/l
  - HEPES, 4-(2 Hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonsäure, (10 mM/l), Böhlinger<sup>®</sup>, Mannheim, Deutschland, Art. 223778
  - Albumin (BSA), bovin, 10g, Sigma - Aldrich<sup>®</sup>, Steinheim, Deutschland, Art. A2153
- Reaktionsmischung:
  - Factor X [Stuart Power Factor], 5 µl (10mU/µl), Sigma<sup>®</sup>, Deisenhofen, Deutschland, Art. F-4634
  - Factor VIIa, 1,5 µl (20nM/µl), human, purified, Alexis<sup>®</sup>, Grünberg, Deutschland, Art. 73560
  - Faktor-Xa-sensitive chromogene Substrat S-2222 (4 mmol/l) Chromogenix<sup>®</sup>, Moindal, Schweden
- Recombinant lipidated human tissue factor (50 ng), American Diagnostic<sup>®</sup>, Greenwich, USA

## **RNA-Isolierung**

- Roti™-Quick-Kit, Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland
- Roti-Quick-Lösung 1 (Guanidinthiocyanat) Art.A976.1
- Roti-Quick-Lösung 2 (Phenol und Chloroform) A.977.1
- Roti-Quick-Lösung 3 (Isopropanol) Art. A978.1

## **Gesamt RNA-Bestimmung**

- 1 x first-strand Puffer, Tris-HCl, Tris-Puffer, 1l (100 mmol/l), 0,2µm gefiltert, Sigma - Aldrich®, Steinheim, Deutschland Art. T6025
- MgCl<sub>2</sub> (Magnesiumchloridhexhydrat), 1kg (10 mmol/l), Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland, Art. 2189,1
- KCl (Kaliumchlorid), 1kg (50 mmol/l), Merck®, Darmstadt, Deutschland, Art. 4936
- randomisierte Hexanucleotide als Primer, 15 nmol/l, Boehringer®, Mannheim, Deutschland
- RNAsin, 20U, Promega®, Madison, WI, USA
- dNTP (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), Böhrringer®, Mannheim, Deutschland Art. 1034731
- Moloney murine Leukämievirus-Reserse-Transkriptase, 100 U, Gibco BRL®, Eggenstein, Deutschland, Art. 28025-013

## **PCR**

- GeneAmp PCR-System 2400, Perkin Eimer®, Wellesley, MA, USA
- PcR-Gerät, Biometra® Tria Thermoblock, Deutschland
- 1x PCR-Puffer (Perkin Elmer), Perkin Eimer®, Wellesley, MA, USA

- 1 mmol/dNTP (dATP, dCTP, dGTP, und dTTP), Perkin Eimer<sup>®</sup>, Wellesley, MA, USA
- spezifische 5'- und 3'- Primern, 0,75 U (1 µmol/l) AmpliTaq DNA-Polymerase, Perkin Eimer<sup>®</sup>, Wellesley, MA, USA
- first-strand cDNA, (2 µl), Perkin Eimer<sup>®</sup>, Wellesley, MA, USA
- intron spanning spezifische Primer, Carl Roth<sup>®</sup>, Karlsruhe, Deutschland
- Tissue-Factor: sense, 5' GCCGCCAACTGGTAGACATG 3' und antisense 5' TAGCCAGGATGATGACAAGG 3'
- β - Aktin – Gen: sense 5' AAAGACCTGTACGCCAACACAGTGCTGTCT 3' und antisense 5' CGTCATACTCCTG CTTGCTGATCCACATCTG 3'
- Angiotensin II – Rezeptor (Subtyp 1 – Losartan – spezifisch ): sense 5' TTATTGATTCACTCTTCTAC 3' und antisense 5' CGAACATGTCAC TCAACCTC 3'

### **Gelelektrophorese**

- 1.8% igem (wt/vol) Nusieve/Agarosegel, Sigma<sup>®</sup>, Deisenhofen, Deutschland
- Ethidiumbromid, 250 mg, Sigma<sup>®</sup>, Deisenhofen, Deutschland, Art. E8751

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

1.6.2003

Lothar Albrecht

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name Lothar Albrecht  
Geboren 14. April 1969 in Hofgeismar  
Nationalität deutsch  
Familienstand ledig  
Konfession evangelisch

## Schulbildung

1975 – 1979 Grundschule Hofgeismar – Hombressen  
1979 – 1985 Gustav – Heinemann – Gesamtschule Hofgeismar,  
Gymnasialzweig  
1985 – 1989 Albert – Schweitzer – Schule Hofgeismar, Gymnasiale  
Oberstufenschule  
Juni 1989 Allgemeine Hochschulreife

## Hochschulbildung

1991 – 1998 Studium der Humanmedizin an der Justus – Liebig – Universität  
Gießen  
1993 Ärztliche Vorprüfung  
1994 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
1997 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
1997 – 1998 Praktisches Jahr an der Justus – Liebig – Universität Gießen  
1998 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## Ärztliche Tätigkeit

1998 – 1999 Arzt im Praktikum am Mathildenhospital in Büdingen bei Herrn  
Dr. med. Victor Becerra-Urtiaga, Chirurgie  
1999 – 2001 Arzt im Praktikum und Assistenzarzt am St. Barbarahospital in  
Gladbeck bei Herrn Dr. med. Heino Terwort, Radiologie  
März 2000 Approbation als Arzt  
Seit Okt. 2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universitätsklinik  
Greifswald bei Herrn Prof. Dr. med. N. Hosten, Institut für  
Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Arbeits –  
schwerpunkt Kardio – MRT