

Julia Anna Tschada

Dr. med.

## **Einfluss von Protein C auf die Leukozytenrekrutierung in vivo**

Fach: Kinderheilkunde

Doktorvater: Prof. Dr. med. Dipl.-Chem. Johannes Pöschl

Protein C ist ein Vitamin K-abhängiges Protein, das hauptsächlich in der Leber, aber auch in Endothelzellen, von verschiedenen Leukozyten und Keratinozyten gebildet wird. Es wird bei akuten Entzündungen in Abhängigkeit vom Ausmaß und der Schwere der Entzündungsreaktion freigesetzt. Protein C hat antikoagulatorische, antiapoptotische und antientzündliche Wirkungen.

Bei schweren Septikämien wurde sowohl aktiviertes Protein C, als auch das Zymogen Protein C therapeutisch eingesetzt. Obwohl gute Ergebnisse im Einzelfall vorlagen, traten ausschließlich nach Gabe der aktivierten Form schwerste Blutungskomplikationen auf, so dass das Präparat zurückgezogen wurde. Zymogen Protein C steht als Ceprotrin® weiter zur Verfügung.

Ziel der hier vorgelegten tierexperimentellen Arbeit war es, bei einer akuten Entzündung die Wirkung von nicht aktiviertem Protein C auf die Leukozytenrekrutierungskaskade (Rollen, Adhäsion und Transmigration) zu definieren und die optimale Dosierung und zeitabhängige Wirkung zu bestimmen. Außerdem sollte der genaue Mechanismus der antientzündlichen Protein C Wirkung gezeigt werden.

In den etablierten Mausmodellen TNF- $\alpha$ - und traumainduzierter Entzündung hemmte Zymogen Protein C die Leukozytenrekrutierung signifikant. Dies konnten wir anhand von intravitalmikroskopischen Untersuchungen am Cremastermuskel der Maus zeigen. Beeinflusst wurde die Leukozytenadhäsion, nicht aber die Leukozytenrollen. Dabei konnten optimale Effekte von Protein C bei einer Dosierung von 100 (U/kg) beobachtet werden. Eine Wirkung auf die Leukozytenrekrutierung war eine Stunde post injectionem nachweisbar und erreichte ihr

Maximum nach drei Stunden. Es kam aufgrund der Bedarfsaktivierung von Protein C zu keinen Veränderungen der Gerinnungsparameter und demnach zu keinen Blutungskomplikationen.

Ferner hemmte Protein C in Gegenwart einer akuten Entzündung signifikant die Leukozytentransmigration entsprechend der histologischen Auswertung der Cremastermuskelpreparate.

Voraussetzung für die antientzündliche Wirkung von Zymogen Protein C ist ein vollständig intakter Aktivierungsvorgang. Hierzu ist Thrombomodulin, EPCR und ein über PAR-1 vermitteltes Protein C-Signaling notwendig, wie unter anderem der Einsatz von TM<sup>pro/pro</sup> Mäusen mit stark reduzierter Protein C-Aktivierbarkeit zeigte.

Mittels Immunhistochemie, Durchflusszytometrie sowie im Knockoutansatz konnte gezeigt werden, dass Protein C seine antientzündliche Wirkung vor allem am Gefäßendothel ausübt, indem es die Expression wichtiger endothelialer Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1 herunterreguliert. VCAM-1 und vor allem ICAM-1 haben eine zentrale, aber keine ausschließliche Funktion bei der Wirkung von Protein C.

Im Gegensatz dazu verändert Protein C die Expression leukozytärer Adhäsionsmolekülen, wie LFA-1 und Mac-1 sowie die des Chemokinrezeptors CXCR2 nicht.

Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass es noch andere  $\beta_2$ -Integrin-Liganden auf dem Endothel geben muss, da der komplette Ausfall von ICAM-1 die Protein C Wirkung nicht aufhebt. Zu diesen Liganden könnte auch RAGE zählen, wie erst kürzlich im Rahmen eines weiterführenden Projektes unserer Arbeitsgruppe beschrieben.

In der Zusammenschau ergibt sich eine klare antiinflammatorische Wirkung von Zymogen Protein C im Mausmodell durch die Blockade der Leukozytenrekrutierung. Die Wirklatenz ist tolerabel. Die Serumspiegel sind im Rahmen der Bedarfsaktivierung limitiert und erreichen nicht den kritischen blutungsauslösenden und komplikationsträchtigen Bereich wie bei der Gabe von aktiviertem Protein C. Wesentliches Target für die Protein C Wirkung ist das Gefäßendothel, auf dem die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 herunterreguliert werden. Eine direkte Wirkung von Protein C auf die Leukozyten lässt sich aus der vorliegende Arbeit nicht ableiten.

Die hier erzielten Resultate könnten auch nach Marktrücknahme des aktivierten Protein Cs dazu beitragen, weitere Studien mit dem Ziel voranzutreiben, den klinischen Einsatz von Zymogen Protein C als supportive Therapie bei akuten Entzündungen und Septikämien im Einzelfall zu erwägen.