



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Die Wirkung von aktiviertem Protein C auf die mRNA-Halbwertszeit
von Chemokinen in humanen Endothelzellen – ein in-vitro
Entzündungsmodell**

Autor: Hans-Martin Weiler
Institut / Klinik: I. Medizinische Klinik
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. G. Huhle

Ziel der Arbeit war es, die antiinflammatorischen Wirkmechanismen von aktiviertem Protein C (APC) bei der Modulation der lokal inflammatorischen Reaktion am Endothel in der Sepsis zu untersuchen. APC nimmt eine zentrale Rolle im Wechselspiel zwischen Gerinnung und Inflammation in der Sepsis ein, indem es die endotheliale Zytokin- und Chemokinexpression moduliert. Das rekombinante humane aktivierte Protein C (rhAPC) findet Anwendung in der Therapie der schweren Sepsis. APC und rhAPC sind in der Lage, die endotheliale Produktion und Freisetzung von Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) über bisher nur ansatzweise geklärte Mechanismen zu stimulieren. Neben seiner chemotaktischen Wirkung auf Monozyten steigert MCP-1 im Tiermodell die Überlebensrate in der Sepsis und ist durch die Förderung der Endothelzellmigration an der Heilung endothelialer Läsionen beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wurde anhand eines in vitro-Entzündungsmodelles mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF- α die Wirkung von APC und rhAPC auf die MCP-1-Freisetzung aus humanen Endothelzellen der Vena umbilicalis (HUVEC) verglichen und die Beteiligung posttranskriptioneller Mechanismen an der MCP-1-Freisetzung untersucht.

APC und rhAPC steigerten gleichermaßen die MCP-1-Freisetzung aus HUVEC in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und -dosis. Dies war in ELISA-Untersuchungen sowohl unter basalen als auch unter inflammatorischen Bedingungen nachweisbar. Weiterhin führte APC zu einer gesteigerten Transkription des MCP-1-Gens unter basalen, nicht jedoch unter inflammatorischen Bedingungen. Die MCP-1-mRNA-Konzentrationen im Zell-Lysat wurden mittels colorimetrischem mRNA-Quantifizierungs-Assay bestimmt. Experimente mit Actinomycin D und Cycloheximid zur selektiven Hemmung der Transkription bzw. der Translation zeigten, dass APC / rhAPC über posttranskriptionelle Mechanismen die MCP-1-Synthese in HUVEC steigert. Nach Hemmung der mRNA-Neusynthese mit Actinomycin D war eine durch rhAPC-Behandlung bedingte, signifikant gesteigerte Halbwertszeit der MCP-1-mRNA mit konsekutiv erhöhten MCP-1-Konzentrationen im Zellüberstand nachweisbar. Vergleichbare Resultate waren auch für das Zytokin Interleukin-8 (IL-8) zu beobachten, welches in der Sepsis die Neutrophilenaktivierung und -adhäsion am Endothel stimuliert und so die Abwehr lokal am Ort der Entzündung fördert. Zur breiten Charakterisierung der Wirkung von APC / rhAPC auf das Endothel wurden Gen-Expressions-Arrays durchgeführt, in welchen weitere Gene identifiziert werden konnten, die durch rhAPC eine Expressionsveränderung erfahren hatten.

Die Beobachtung, dass APC bzw. rhAPC die Freisetzung von Chemokinen aus HUVEC über die Hemmung des mRNA-Abbaus beeinflussen kann, stellt einen neuartigen immunmodulatorischen Mechanismus dar, durch welchen APC bzw. rhAPC möglicherweise die lokale inflammatorische Antwort des Immunsystems in der Sepsis modulieren. Die vorgelegten Daten tragen so zum genaueren pathophysiologischen Verständnis der Wirkmechanismen von aktiviertem Protein C in der Sepsis bei.