



**University of  
Zurich**<sup>UZH</sup>

**Zurich Open Repository and  
Archive**

University of Zurich  
Main Library  
Strickhofstrasse 39  
CH-8057 Zurich  
[www.zora.uzh.ch](http://www.zora.uzh.ch)

---

Year: 2008

---

**Einfluss von Rapamycin, FK-506 und Paclitaxel auf die endotheliale Tissue  
Factor Expression**

Zimmermann, D

Posted at the Zurich Open Repository and Archive, University of Zurich

ZORA URL: <https://doi.org/10.5167/uzh-10679>

Dissertation

Published Version

Originally published at:

Zimmermann, D. Einfluss von Rapamycin, FK-506 und Paclitaxel auf die endotheliale Tissue Factor Expression. 2008, University of Zurich, Faculty of Medicine.

Universität Zürich  
Physiologisches Institut  
Vorsteher: Prof. Dr. med. F. Verrey  
Kardiovaskuläre Forschung  
Leiter: Prof. Dr. med. F. C. Tanner

Universitätsspital Zürich  
Klinik für Kardiologie  
Direktor: Prof. Dr. med. T. F. Lüscher  
Bereich II Leiter: Prof. Dr. med. T. F. Lüscher  
Departement Innere Medizin

---

Arbeit unter Leitung von Dr. med. J. Steffel

**Einfluss von Rapamycin, FK-506 und Paclitaxel auf die endotheliale  
Tissue Factor Expression**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät  
der Universität Zürich

vorgelegt von  
**Dorothee Zimmermann**  
**von Adelboden BE**

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. med. F. C. Tanner  
Zürich 2008

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
1. Abkürzungen _____	<u>2</u>
2. Zusammenfassung _____	<u>3</u>
3. Einleitung _____	<u>4</u>
4. Methoden _____	<u>8</u>
5. Resultate _____	<u>16</u>
6. Abbildungen und Legenden _____	<u>19</u>
7. Diskussion _____	<u>23</u>
8. Literaturverzeichnis _____	<u>28</u>
9. Verdankungen _____	<u>33</u>
10. Curriculum Vitae _____	<u>34</u>

## 1. Abkürzungen

TF	Tissue Factor
HAEC	Human Aortic Endothelial Cells (humane aortale Endothelzellen)
p70S6K	p70S6-Kinase
mTOR	Mammalian Target Of Rapamycin (Zielprotein von Rapamycin)
FKBP-12	FK-Bindungsprotein-12
DES	Drug Eluting Stents (Pharmaka eluierende Stents)
PTCA	Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty (perkutane transluminale Koronarangioplastie)
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cells (glatte Gefäßsmuskelzellen)
EGM-2	Endothelial Growth Medium (Endothelzell-Wachstumsmedium)
EBM	Endothelial Basal Medium (Basales Endothelzellmedium)
FCS	Fetal Calf Serum (fötales Kalbsserum)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Gefäßendothel-Wachstumsfaktor)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-Salz-Puffer)
LDH	Lactat-Dehydrogenase
BSA	Bovines Serum Albumin
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
BME	Beta-Mercaptoethanol
$\alpha$ T	$\alpha$ -Tubulin
GAPDH	Glycerinaldehyd-Dehydrogenase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase

## 2. Zusammenfassung

**Fragestellung** – Rapamycin, FK-506 und Paclitaxel werden in Stents zur Verminderung der Restenose eingesetzt. In dieser Arbeit wird der Einfluss dieser Substanzen auf die thrombin-induzierte endotheliale TF (Tissue Factor) Expression untersucht.

**Methoden und Resultate** – HAEC (Humane aortale Endothelzellen) wurden mit Rapamycin, FK-506 oder Paclitaxel für eine Stunde inkubiert, gefolgt von einer 5-stündigen Stimulation mit Thrombin (1 Unit/ml). Nach Lyse der Zellen wurde die TF Expression mittels Western Blot analysiert. Rapamycin und Paclitaxel ( $10^{-8}$ - $10^{-7}$  mol/l) verstärkten die TF Expression in konzentrationsabhängiger Weise. Bei Rapamycin war die Expression bei  $10^{-7}$  mol/l im Vergleich mit Thrombin allein um den Faktor 2.3 erhöht; darüber hinaus wurde die TF Oberflächenaktivität nach Vorinkubation mit Rapamycin ( $10^{-7}$  mol/l) um das 1.4-fache gesteigert. Auch die basale TF Expression wurde durch Rapamycin ( $10^{-7}$  mol/l) um das 1.3-fache erhöht. Nach Vorinkubation mit Paclitaxel ( $10^{-7}$  mol/l) zeigte sich ein maximaler Anstieg der thrombin-induzierten TF Expression um den Faktor 1.6. FK-506 ( $10^{-8}$ - $10^{-7}$  mol/l) führte zu keiner Veränderung der thrombin-induzierten TF Expression. Der Effekt von Rapamycin ( $10^{-7}$  mol/l) auf die thrombin-induzierte TF-Expression konnte durch FK-506 ( $10^{-9}$ - $10^{-7}$  mol/l) antagonisiert werden. Thrombin führte zu einer transienten Dephosphorylierung von p70S6K (p70S6-Kinase), einem Zielprotein des durch Rapamycin hemmbaren mTOR (mammalian Target Of Rapamycin). Durch Rapamycin ( $10^{-7}$  mol/l) wurde die p70S6K-Phosphorylierung völlig inhibiert, während FK-506 ( $10^{-7}$  mol/l) keinen Effekt zeigte.

**Schlussfolgerungen** – Rapamycin und Paclitaxel, nicht aber FK-506, verstärken die thrombin-induzierte TF Expression. Die Wirkung von Rapamycin geschieht über Bindung an FKBP-12 (FK-Binding Protein-12) via Hemmung von mTOR. Die Ergebnisse könnten von wichtiger klinischer Bedeutung sein, da die Verstärkung der thrombin-induzierten TF Expression die Entstehung von In-Stent-Thrombosen in mit Pharmaka beschichteten Stents begünstigen könnte.

### 3. Einleitung

Die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) mit Implantation eines Stents, der das Gefäß offen hält, ist die Methode der Wahl zur Behandlung von Patienten mit akutem Koronarsyndrom [1, 2]. Eingeführt wurde die Therapie mit Stents ursprünglich zur Behandlung von Komplikationen nach PTCA [1]. Auf Abbildung 1 ist ein mit Rapamycin beschichteter „CYPHER“-Stent der Firma Cordis dargestellt. (Quelle: <http://www.cordis.com/>)

Abb. 1



Die Restenose, welche definiert ist als Verkleinerung des Lumens um  $>50\%$ , stellt ein Problem nach solchen Eingriffen dar [3]. Histologische Untersuchungen von menschlichen Koronarien nach Stent-Implantation zeigten folgendes Reaktionsmuster: In der frühen Phase bilden sich Thromben und es entwickelt sich eine akute Entzündungsreaktion. Später kommt es zur Ausbildung der Neo-Intima, welche vor allem aus eingewanderten glatten Muskelzellen besteht [4, 5]. Entzündungsreaktion und Intimaneubildung werden gefördert durch Verletzung der Gefäßmedia während der PTCA [5]. Die Hyperplasie dieser neugebildeten Intima wird als Hauptursache der Restenose angesehen [4, 6]. Dabei spielen vor allem die Migration und exzessive Proliferation von glatten Muskelzellen eine wichtige Rolle [4]. Zahlreiche Studien konnten die Überlegenheit der Stent-Implantation gegenüber der Ballon-Dilatation in Bezug auf die Reduktion der Restenoserate und der Notwendigkeit einer erneuten Revaskularisation zeigen [1, 7-9]. Trotz diesen Verbesserungen im Vergleich zur alleinigen Ballon-Dilatation beträgt die Restenoserate nach Implantation eines herkömmlichen, unbeschichteten Stents immer noch 15-40% [3].

Ein Fortschritt in der Stent-Therapie stellt die Beschichtung der Stents mit Medikamenten dar, welche durch Hemmung der Proliferation und Migration der glatten Muskelzellen die Neointimahyperplasie vermindern. Diese Medikamente führten zu einer erheblichen Senkung der Restenoserate [3], wie in prospektiven Studien für Rapamycin (Sirolimus) [10, 11] und Paclitaxel [12] gezeigt wurde. Für FK-506 (Tacrolimus) liegen noch keine aussagekräftigen grösseren klinische Studien vor, in Tierversuchen konnte jedoch auch hier eine Verminderung der Restenose gezeigt werden [13, 14].

Rapamycin ist ein Makrolid-Antibiotikum, welches als Immunsuppressivum eingesetzt wird; es bildet intrazellulär einen Komplex mit FKBP-12 und übt so einen hemmenden Effekt auf das „mammalian target of rapamycin“ (mTOR) aus. Hieraus resultiert eine Hemmung der durch proinflammatorische Zytokine hervorgerufenen intrazellulären Signalkaskade [15]. Rapamycin reduziert die Restenoserate, indem es sowohl die Proliferation als auch die Migration von glatten Gefässmuskelzellen (vascular smooth muscle cells - VSMC) hemmt. Sein antiproliferativer Effekt auf VSMC wird unter anderem durch Interaktion mit CDK (Cyclin Dependent Kinasen) (z.B. p33<sup>cdk2</sup>- und p34<sup>cdk2</sup>-kinase) und pRb (Retinoblastoma Protein) bewirkt, was zu einer Arretierung der Zellen in der G1-Phase führt [16, 17]. Daneben hemmt es die Migration von VSMC, wahrscheinlich ebenfalls über Hemmung von mTOR, welches am Signalweg der durch Proteine der extrazellulären Matrix stimulierten Migration beteiligt ist [18, 19].

FK-506 ist ebenfalls ein Makrolid, das auf DES verwendet werden kann. Es bindet wie Rapamycin an FKBP-12; anders als der Rapamycin-FKBP-12-Komplex hat der FK506-FKBP-12-Komplex jedoch keine Wirkung auf mTOR, sondern übt seine immunsuppressive Wirkung über Inhibition von Calcineurin aus, was zur Hemmung der Signaltransduktion vor allem in T-Lymphozyten führt [20]. Ausserdem unterdrückt es die Bildung von wachstumsfördernden Zytokinen und Protoonkogenen [20]. Auch FK-506 hat antiproliferative Effekte auf VSMC, jedoch in geringerer Masse als Rapamycin [21, 22].

Auf die Migration der glatten Muskelzellen hat FK-506 in den Konzentrationen, wie sie für Rapamycin gebraucht werden, aber keine Wirkung [18].

Paclitaxel ist ein Zytostatikum, welches in der Therapie von Malignomen etabliert ist; seine Wirkung kommt über Interaktionen mit den Mikrotubuli zustande, welche in der Zellteilung eine wichtige Rolle spielen. Es bindet während der Mitose an Mikrotubuli und

stabilisiert ihre polymerisierte Form, womit die Zellen am Übergang von der Metaphase zur Anaphase gehindert werden [23]. Auf VSMC hat es ähnlich wie Rapamycin einen antiproliferativen und antimigratorischen Effekt [24].

Trotz der erheblichen Senkung der Restenoserate durch die Verwendung dieser Pharmaka, hat die Verwendung von DES nicht zu einer Senkung der In-Stent-Thromboserate gegenüber unbeschichteten Stents (BMS) geführt, wie eine Meta-Analyse von Rapamycin- und Paclitaxel eluierenden Stents zeigte [3]. Tatsächlich wurden bereits mehrere hundert Fälle von subakuten (< 30 Tage nach Implantation) In-Stent-Thrombosen in Rapamycin-freisetzenden Stents berichtet [25]. Ausserdem sind mehrere Fälle von späten In-Stent-Thrombosen beschrieben, die sich über 7 Monate nach der Implantation von Rapamycin- und Paclitaxel freisetzenden Stents ereigneten, zumeist nach Absetzen von Thrombozytenaggregationshemmern [26-28]. Die In-Stent-Thrombose ist insgesamt eine seltene, jedoch äusserst gefürchtete Komplikation, da sie mit einer hohen Infarktrate und Letalität einhergeht [29, 30]. Es gibt verschiedene Faktoren, die in der Pathogenese der In-Stent-Trombose diskutiert werden: Die Prozedur der Stent-Platzierung, Thrombogenität des Stents selber (welche vom Material, dem Design oder zusätzlicher Brachytherapie abhängen kann), sowie patienten- und läsionsabhängige Faktoren [29].

Tissue Factor (TF), auch Gerinnungsfaktor III oder Thromboplastin genannt, ist ein Membran-gebundenes Glykoprotein und ein entscheidender Initiator der Gerinnungskaskade. Er setzt den extrinsischen Weg der Blutgerinnung in Gang, indem er mit Faktor VIIa einen Komplex bildet, welcher Faktor IX aktiviert. Dieser wiederum aktiviert Faktor X, was zur Bildung von Thrombin führt, welches die Fibrinbildung und Plättchenaggregation initiiert; TF besitzt so eine entscheidende Rolle bei der Hämostase, aber auch bei Entstehung von Thrombosen [31, 32]. Subendothelial wird TF von verschiedensten Zelltypen in den Gefässwänden exprimiert, so zum Beispiel von glatten Muskelzellen in der Media und von Fibroblasten in der Gefässadventitia [31]. Bei Verletzung des Gefässes kommen somit Gerinnungsfaktoren mit TF in Kontakt und setzen so physiologischerweise die Gerinnung in Gang. Im Unterschied dazu wird TF normalerweise nicht auf Endothelzellen exprimiert und kommt somit nicht mit zirkulierendem Blut in Berührung [31]. Die Expression von TF auf Endothelzellen kann



durch verschiedene Faktoren, unter anderem Endotoxin, TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ), Histamin und Thrombin, stimuliert werden [31, 33, 34].

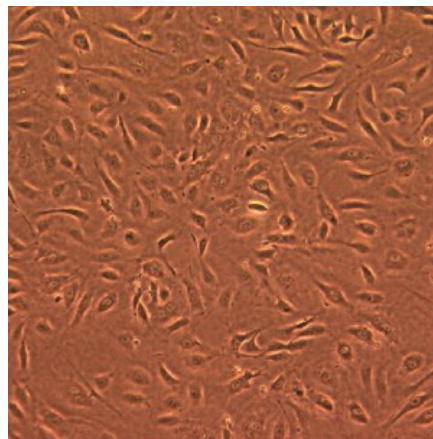
Ob die Pharmaka, welche zur Beschichtung von Stents verwendet werden, die Expression von TF in Endothelzellen beeinflussen können, ist bisher jedoch nicht bekannt. In dieser Arbeit wurde daher der Einfluss von Rapamycin, FK-506 und Paclitaxel auf die endotheliale TF Expression untersucht. Ausserdem wurde analysiert, welche Rolle mTOR in der TF Regulation spielt.

## 4. Methoden

### Zellkultur

HAEC (Passage 7-9, Clonetics, Allschwil, Schweiz) wurden in mit Fibronectin (Chemicon, Dietikon, Schweiz) beschichteten 15 cm-Schalen in 20 ml EGM-2-Medium (Endothelial Growth Medium [Wachstumsmedium] von Clonetics) bei 37°C, 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Abbildung 2 zeigt als Beispiel HAEC in Kultur unter dem Lichtmikroskop. (Quelle: <http://www.cambrex.com/>)

### Abb. 2



EGM-2 enthält als Zusatz 10% FCS (fötales Kalbsserum), ausserdem wurden weitere Wachstumsfaktoren und Medikamente beigefügt: Hydrocortison, hFGF-B (human Fibroblast Growth Factor-Basic), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), R<sup>3</sup>-IGF (Insulin-like Growth Factor Analogon), Ascorbinsäure, hEGF (human Epidermal Growth Factor), Gentamycin und Heparin. 24 Stunden nach Auftauen der Zellen wurde das Medium erneuert. 1-2 Tage später, wenn die Zellen subkonfluent (80-90%) waren, wurden sie auf kleinere 6 cm-Schalen ausplattiert. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit EDTA (Ethylen-Diamin-Tetraacetat)-Lösung gewaschen und danach 5 Minuten im Brutschrank mit Trypsin-EDTA inkubiert, was zur Ablösung der Zellen von der Unterfläche führte. Um nach 5 Minuten die Trypsin-Reaktion zu stoppen, wurde EGM-2 Medium beigefügt. Diese Zell-Suspension wurde nun zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in EGM-2 resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde die Zell-Suspension in vorher mit Fibronectin beschichtete 6 cm-Schalen verteilt und

zwar so, dass sich auf jeder Schale  $5 \times 10^5$  Zellen in je 3 ml Medium befanden. Die gesplitteten Zellen wurden nach 24 Stunden in ihrem Wachstum arretiert, indem das EGM-2-Wachstumsmedium durch EBM(Endothelial Basal Medium)-Arretiermedium (Clonetics) ersetzt wurde. EBM enthält als Zusatz 0.5% FCS, sowie Gentamycin. Wiederum 24 Stunden später wurde mit den Experimenten begonnen. Rapamycin (Sigma, München, Deutschland), FK-506 (Alexis, Lausen, Schweiz), Paclitaxel (Sigma), LY294002 (Cell Signaling, Allschwil, Schweiz) oder Wortmannin (Sigma) wurden in DMSO (Dimethyl-Sulfoxid) gelöst und in den entsprechenden Konzentrationen für 1 Stunde zu den Zellen gegeben. Um den Einfluss der Pharmaka auf die thrombin-induzierte TF Expression zu messen, wurden die Zellen mit Thrombin (1 Unit/ml, gelöst in PBS [Phosphat-Salz-Puffer]) für weitere 5 Stunden stimuliert. Für die Untersuchung der p70S6K-Phosphorylierung wurden die Zellen für 0-60 Minuten stimuliert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen auf Eis gekühlt und zweimal mit PBS gewaschen, um die Einwirkung der Präparate zu stoppen. Danach wurden die Zellen für 10 Minuten mit Lysepuffer inkubiert.

Zusammensetzung Lysepuffer (in Wasser):

- 50 mM TRIS pH 7.5
- 150 mM NaCl
- 1 mM EDTA
- 1 mM NaF (Natriumfluorid)
- 1 mM DTT (Dithiotreitol)
- 10 µg/µl Aprotinin
- 10 µg/µl Leupeptin
- 0.1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (Sodium Orthovanadate)
- 1 mM PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)
- 5 g/l NP-40 (Nonidet P-40)

Die lysierten Zellen wurden mit einem Cell-Scraper von den Schalen gekratzt und in Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Die Zelllysate wurden mit 14`000 Umdrehungen/min bei 4°C während 10 Minuten zentrifugiert. Der die Proteine enthaltende Überstand wurde weiterverwendet, das Pellet wurde verworfen.

### LDH-Assay

Um eine allfällige Zytotoxizität der Substanzen zu messen, wurde die Freisetzung von LDH (Laktat-Dehydrogenase), einem zytoplasmatischen Enzym, das bei Zellschaden freigesetzt wird, mittels eines kolorimetrischen Assays (Roche, Mannheim, Deutschland) bestimmt. Das Prinzip des Assays beruht darauf, dass LDH, durch Oxidation seines Substrates Laktat, NAD<sup>+</sup> (Nicotinamin-Adenid-Dinukleotid) zu NADH/H<sup>+</sup> reduziert. Der zugegebene Katalysator (Diaphorase) katalysiert die NADH abhängige Reduktion von Tetrazolium-Salz zu Formazan-Salz, welches als roter Farbstoff photometrisch mit einem ELISA(Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay)-Reader bei einer Wellenlänge von 490 nm bestimmt werden kann. Je mehr von diesem Farbstoff entstanden ist, desto mehr LDH war im Zellüberstand vorhanden, und umso mehr Zellen waren somit während der Inkubationszeit mit den Präparaten lysiert worden.

Nach erfolgtem Experiment wurde daher zur Testdurchführung aus jeder Schale 500 µl Überstandsmedium entnommen. Von jeder der Proben wurde in einer Mikrotiter-Platte eine 1:2-Verdünnungsreihe erstellt. Als Hintergrundkontrolle diente frisches Medium und als Referenz für die maximale Lyse der Überstand von vorher mit dem Detergens Triton (Endkonzentration 1%) behandelten Zellen. Triton löst durch seine Detergenswirkung die Phospholipidmembranen der Zellen auf, was zur Zerstörung aller Zellen führt. Die gemessenen LDH-Werte waren für diese Zellzahl somit maximal. Die Proben in der Mikrotiter-Platte wurden nun für 30 Minuten im Dunkeln mit dem Katalysator und der Farblösung inkubiert und die Absorption bei 490 nm bestimmt. Die Zytotoxizität wurde berechnet, indem der Absorptionswert der Probe jeweils von dem Wert der unstimulierten Kontrolle subtrahiert wurde, und dieses Resultat dann durch die Absorption der maximalen Lyse minus Kontrolle geteilt wurde ( $\frac{[x\text{-Kontrolle}]}{[\text{Maximum-Kontrolle}]}$ ).

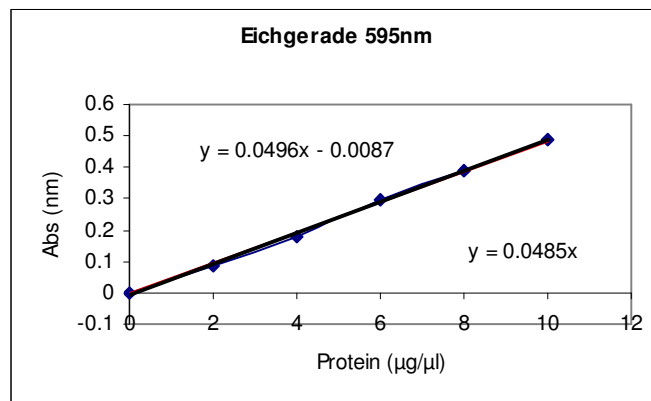
### Western Blot Analyse

#### *Messung der Proteinkonzentration*

Die Gesamtproteinkonzentration der Zelllysate wurde mittels der Methode nach Bradford gemessen. Es wurden hierfür je 4 µl der Proben mit 0.996 ml Proteinassay-

Reagens (Biorad, Reinach, Schweiz) in einer Küvette vermischt und 5 Minuten bei Dunkelheit inkubiert. Die Proteine binden dabei an das Reagens, den Coomassie Brilliant Blue G-50 Farbstoff, was zu dessen Farbänderung führt. Die Absorption kann dann bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen werden. Als Referenz wurde eine vorher erstellte Standardkurve mit BSA (bovines Serum-Albumin, Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK) in Konzentrationen von 2 bis 10 µg/µl verwendet. Die Konzentrationen wurden anhand der Geradengleichung errechnet (Beispiel siehe Abb. 3).

Abb.3



### *SDS-PAGE*

Mit Hilfe der gemessenen Proteinkonzentrationen wurden die Elektrophorese-Proben so mit Zelllysat, Wasser und Ladepuffer präpariert, dass in jeder Probe 40 µg Protein vorhanden war. Um die Proteine zu denaturieren, wurden die Proben während 6 Minuten bei 95°C erhitzt. Zur Proteinauftrennung nach Molekulargröße wurde die SDS-PAGE (Sodium Dodecylsulfat Polyacrylamid Gel-Elektrophorese) verwendet. Durch Bindung des stark negativen Detergens SDS an die Proteine wird erreicht, dass sämtliche Proteine lediglich aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargröße aufgetrennt werden.

Zusammensetzung Ladepuffer (in Wasser, 10-fach konzentriert):

- 500 mM TRIS-Puffer pH 6.5
- 200 g/l SDS

- 2 g/l Bromphenol-Blau
- 2.71 M Glycerin
- 700 mM BME (Beta-Mercaptoethanol)

Die Gele wurden in Kammern aus Glasplatten zusammengegossen. Zuerst wurden die Laufgele hergestellt, 2 Stunden später wurden die Ladegele eingegossen und mit einem Kamm bestückt. Die Laufgele mussten mindestens 4 Stunden, die Ladegele mindestens 2 Stunden polymerisieren.

Zusammensetzung der Gele in Wasser:

	<u>Laufgel (8%)</u>	<u>Laufgel (10%)</u>	<u>Ladegel</u>
- Acrylamid-Mix:	- 81 g/l	- 99 g/l	- 51 g/l
-TRIS:	- 375 mM (pH 8.8)	- 375 mM (pH 8.8)	- 130 mM (pH 6.8)
- SDS:	- 1g/l	- 1 g/l	- 1 g/l
- Ammoniumpersulfat:	- 1 g/l	- 1 g/l	- 1 g/l
-TEMED:	- 4.00 mM	- 2.67 mM	- 6.67 mM
	(N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin)		

Die Porengrösse der Laufgele wird bestimmt durch die Acrylamid-Konzentration; für die Detektion von TF wurden 10%ige Acrylamidgele verwendet, und für die grösseren Proteine mTOR und p70S6K 8%ige Gele. Für die Elektrophorese wurde Laufpuffer mit der folgenden Zusammensetzung (gelöst in Wasser) verwendet:

- 15.1 g/l TRIS- Base
- 94.4 g/l Glycin
- 5 g/l SDS

Der pH-Wert des Puffers wurde mit 1 molarer HCL-Lösung auf 8.3 eingestellt. Die Elektrophorese wurde während ungefähr 10-16 Stunden mit einer Spannung von circa 37-48 Volt laufen gelassen.

### *Blotting und Immundetektion*

Nachdem die Proteine im Gel aufgetrennt waren, wurden sie mittels Elektroblothing auf eine vorher mit Methanol aktivierte PVDF(Polyvinylidenfluorid)-Membran (Millipore, Billerica, USA) transferiert. Dies wurde folgendermassen durchgeführt: Das Gel, die Membran und die Blotting-Papiere wurden erst während 10 Minuten in Transferpuffer äquibriert.

Zusammensetzung Transferpuffer (in Wasser):

- 3.03 g/l TRIS-Base
- 14.4 g/l Glycin
- 0.38 g/l SDS
- 3.7 M Methanol

Danach wurde zuerst eine Schicht Blotting-Papier, dann die Membran, das Gel und schliesslich wieder eine Schicht Blotting-Papier aufeinander in den Transfer-Apparat gelegt. Der Transfer wurde mit einer Stromstärke von 180 mA während 40–60 Minuten durchgeführt. Der Strom wurde so angelegt, dass er senkrecht von oben nach unten durch alle Schichten floss und dazu führte, dass die Proteine vom oben liegenden Gel auf die Membran transferiert wurden. Im Anschluss an den Transfer wurde die Membran unter ständigem Schütteln eine Stunde in Blocklösung (5% Milchpulver in PBS-T [PBS mit 0.1% Tween 20]) geblockt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern.

Zusammensetzung PBS (in Wasser):

- 8 g/l NaCl
- 0.2 g/l KCl
- 1.15 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (Sodium phosphate Dibasis Heptahydrate)
- 0.2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Potassium phosphate Monobasis)

Zur TF-Detektion wurde ein muriner Anti-TF-Antikörper (American Diagnostica, Pfungstadt, Deutschland) 1: 2`000 in der Blocklösung vedünnt und während einer Stunde inkubiert. Anschliessend wurde die Membran 3x10 Minuten mit PBS-T

gewaschen und wiederum für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper inkubiert (Anti-Maus-Antikörper von Amersham Bioscience, gelabelt mit Horseradish Peroxidase, 1:2`500 Verdünnung). Bei der Detektion von p70S6K wurde als Blocklösung 5%iges BSA in PBS-T verwendet, in welchem danach auch der 1. Antikörper gelöst wurde. Dieser wurde über Nacht bei 4°C unter sanftem Schütteln inkubiert. Folgende Antikörperverdünnungen wurden für die Erstantikörper verwendet: Anti-phospho-p70S6K-Antikörper: 1:4`000, anti-p70S6K-Antikörper: 1:3`000 (beide polyklonale Kaninchen-Antikörper von Cell Signaling). Nach Waschen mit PBS-T (3x10 Minuten) wurde für eine Stunde mit Peroxidase-markiertem Anti-Kaninchen-Antikörper (Amersham Bioscience) – analog zu oben - in 1: 2`500 Verdünnung, gelöst in Milch-PBS-T, inkubiert.

Im Anschluss an den Zweitantikörper wurde nach erneutem Waschen mit PBS-T (3x10 Minuten) zur Detektion für 5 Minuten ECL-Lösung (Amersham Bioscience) auf die Membran gegeben. Die an den Zweitantikörper gebundene Peroxidase katalysiert die Oxidation des im ECL enthaltenen Luminol durch Wasserstoffperoxid. Das Luminol gelangt dadurch in einen angeregten Zustand und fällt unter Aussendung von Licht wieder in den Grundzustand zurück. Diese Lichtemission kann auf Photopapier dargestellt werden. Die entwickelten Photos wurden in den Computer eingescannt und mittels des Scion-Image-Programmes (Scion Corporation, Maryland, USA) densitometriert.

Zur Ladekontrolle wurde  $\alpha$ -Tubulin ( $\alpha$ T), ein konstitutiv exprimiertes Strukturprotein, verwendet und das Ergebnis damit abgeglichen. Da Paclitaxel mit den Mikrotubuli interferiert, welche aus Tubulin aufgebaut sind, wurde bei den Experimenten mit dieser Substanz die Ladekontrolle mit GAPDH (Glycerinaldehyd-Dehydrogenase), einem anderen konstitutiv exprimierten Protein, durchgeführt. Der Antikörper gegen  $\alpha$ -Tubulin (Sigma) wurde 1: 25`000–1:40`000 verdünnt, derjenige gegen GAPDH (Santa Cruz, Santa Cruz, USA) 1:20`000. Die Detektion wurde analog zur TF-Detektion durchgeführt.



### *Stripping*

Vor einer zweiten Immundetektion auf einer Membran wurde diese nochmals kurz in PBS gewaschen und getrocknet. Im Anschluss wurden die Antigen-Antikörperbindungen auf der Membran durch Reduktionswirkung gelöst. Dies wurde erreicht, indem die Membran nach der Aktivierung mit Methanol und kurzem Waschen in PBS während 30–40 Sekunden in Stripping Puffer inkubiert wurde. Nach erneutem Waschen mit PBS konnte die Immundetektion wie oben beschrieben erneut durchgeführt werden.

Zusammensetzung Stripping Puffer (in Wasser):

- 20 g/l SDS
- 62.5 M TRIS pH 6.8
- 80.08 mM BME

### TF-Oberflächenaktivität

Die TF-Oberflächenaktivität wurde mittels eines kolorimetrischen Assays (American Diagnostica) gemessen. Die Endothelzellen wurden in Zwölf-Well-Platten kultiviert. Nach Stimulation mit Thrombin +/- Rapamycin wurden sie zweimal mit PBS gewaschen und danach bei 37°C mit Faktor VIIa und Faktor X inkubiert. Dabei bildet der TF an der Oberfläche der Zellen mit Faktor VIIa einen Komplex. Der TF/ Faktor VIIa-Komplex führt zur Aktivierung von Faktor X, welcher ein chromogenes Substrat metabolisiert und so photometrisch messbar ist. Als Positivkontrolle wurde rekombinanter humaner TF verwendet, um sicherzustellen, dass sich die gemessenen Resultate im linearen Bereich befinden.

### Statistik

Die Daten sind als Mittelwerte aus allen Experimenten +/- Standardfehler dargestellt. Für die statistische Analyse wurde der ungepaarte Student's t-Test verwendet;  $p < 0.05$  wurde als signifikant angesehen.

## 5. Resultate

### Rapamycin verstärkt die TF Expression in Endothelzellen

Die Stimulation der Zellen mit Thrombin (1 Unit/ml) während 5 Stunden erhöhte die TF Expression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle um das 23-fache. Wurden die Zellen eine Stunde vor Stimulation mit Rapamycin in Konzentrationen von  $10^{-8}$ - $10^{-7}$  mol/l vorinkubiert, verstärkte dies die TF Expression in konzentrationsabhängiger Weise. Bei der höchsten Konzentration ( $10^{-7}$  mol/l) war die Expression 2.3 Mal stärker als nach Stimulation mit Thrombin allein (Abb. 4A). Wurden Endothelzellen für 6 Stunden mit Rapamycin ( $10^{-8}$ - $10^{-7}$  mol/l) ohne Thrombin stimuliert, erhöhte dies die TF Expression um das 1.3-fache ( $10^{-7}$  mol/l, Abb. 4B). Die Erhöhung der TF Expression nach Präinkubation mit Rapamycin ging mit einer erhöhten TF Aktivität einher. Tatsächlich zeigte sich bei der höchsten Konzentration von  $10^{-7}$  mol/l eine 1.4-fache Verstärkung der Aktivität im Vergleich zu Thrombin allein (Abb. 4C). Die Messung der LDH-Freisetzung ergab keine signifikante Zytotoxizität von Rapamycin (n=4, Tabelle 1).

Tab. 1	Zytotoxizität in % des Maximums	p-Wert vs. Thrombin
Thrombin (1U/ml)	0.80%	
Thrombin (1U/ml)+ Rapamycin ( $10^{-8}$ mol/l)	1.50%	0.7608 (n.s)
Thrombin (1U/ml)+ Rapamycin ( $10^{-7}$ mol/l)	1.54%	0.7863 (n.s)

### FK-506 hat keinen Einfluss auf die endotheliale TF Expression

Die Inkubation von Endothelzellen mit FK-506 ( $10^{-8}$ - $10^{-7}$  mol/l) vor Stimulation mit Thrombin führte zu keiner signifikanten Änderung der TF Expression (Abb. 5). Auch hier wurde keine Zytotoxizität festgestellt (n=4, Tabelle 2)

Tab. 2	Zytotoxizität in % des Maximums	p-Wert vs. Thrombin
Thrombin (1U/ml)	-1.19%	
Thrombin (1U/ml)+FK506 ( $10^{-8}$ mol/l)	0.24%	0.4478 (n.s.)
Thrombin (1U/ml)+FK506 ( $10^{-7}$ mol/l)	-0.01%	0.5217 (n.s.)

### Paclitaxel verstärkt die thrombin-induzierte TF Expression in Endothelzellen

Wurden die Endothelzellen 1 Stunde mit Paclitaxel ( $10^{-8}$ - $10^{-7}$  mol/l) vorinkubiert, führte dies zu einer leichten Erhöhung der TF Expression. Bei der höchsten Konzentration zeigte sich eine 1.6-fache Erhöhung im Vergleich mit Thrombin allein (Abb. 6). Die Messung der LDH-Freisetzung ergab keine signifikante Zytotoxizität von Paclitaxel (n=4, Tabelle 3).

<u>Tab. 3</u>	Zytotoxizität in % des Maximums	p-Wert vs. Thrombin
Thrombin (1U/ml)	-0.13%	
Thrombin (1U/ml)+Paclitaxel ( $10^{-8}$ mol/l)	-0.23%	0.9459 (n.s.)
Thrombin (1U/ml)+Paclitaxel ( $10^{-7}$ mol/l)	-0.55%	0.8052 (n.s.)

### Rapamycin verstärkt die TF Expression durch Bindung an FKBP-12

FK-506 und Rapamycin binden kompetitiv an FKBP-12. HAEC wurden zuerst mit FK-506 in Konzentrationen von  $10^{-9}$ - $10^{-7}$  mol/l und nach 30 Minuten mit Rapamycin ( $10^{-7}$  mol/l) vorinkubiert. Eine Stunde später wurde Thrombin (1 Unit/ml) beigefügt und nach 5 Stunden lysiert. Das vorher zugefügte FK-506 führte zu einer Reduktion des Effektes von Rapamycin auf die thrombin-induzierte TF Expression. Die Expression betrug bei der höchsten Konzentration von FK-506 ( $10^{-7}$  mol/l) noch 77% der alleine mit Thrombin und Rapamycin stimulierten Zellen (Abb. 7).

### Rapamycin verstärkt die TF Expression durch Hemmung von mTOR

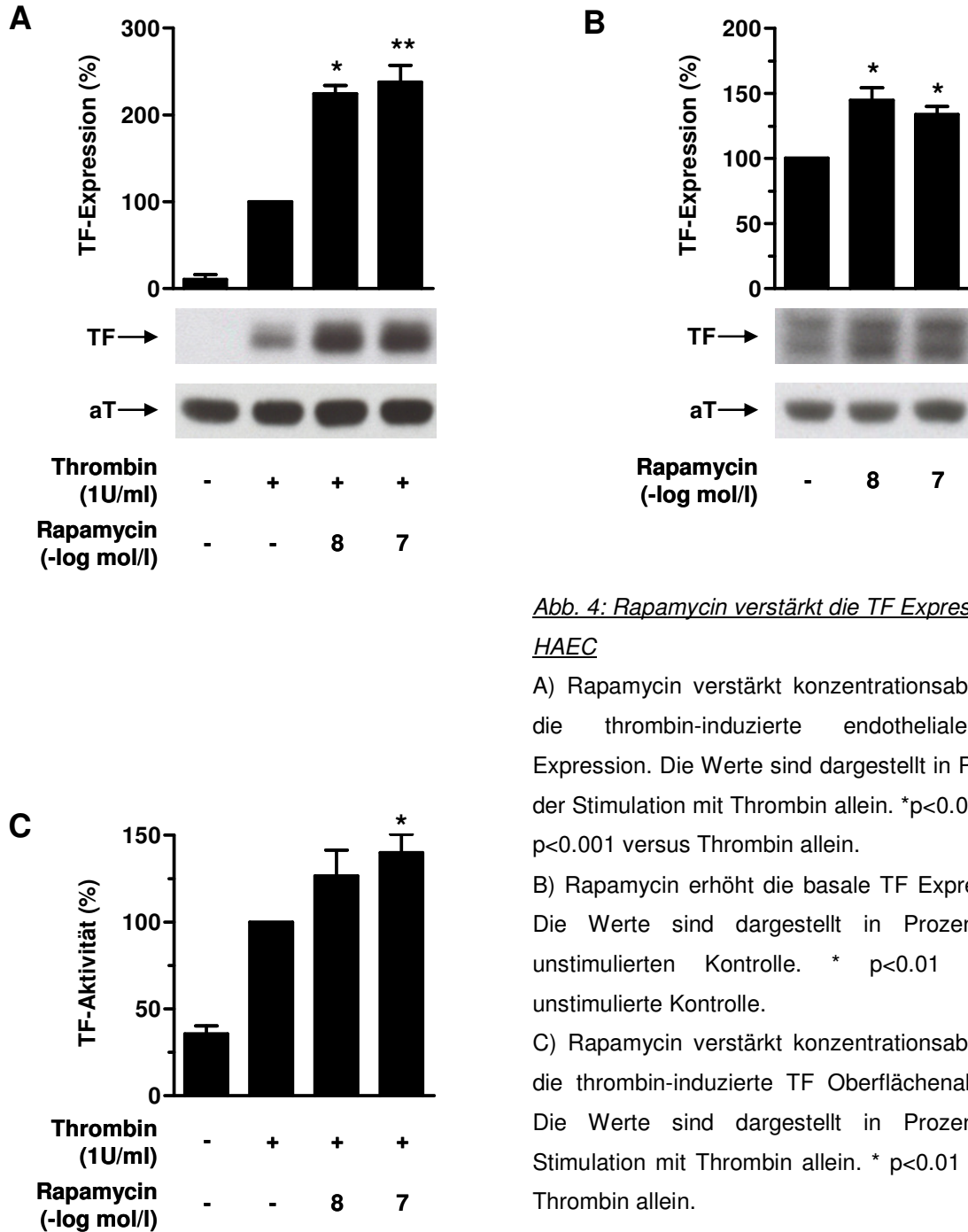
Die p70S6K wird von mTOR positiv reguliert. Aktivierung führt unter anderem zu Phosphorylierung an Threonin 389. Die Messung des Anteils der phosphorylierten Form wird oft benutzt, um die Aktivität von mTOR, welches durch Rapamycin gehemmt wird, zu messen [35, 36].

Humane Endothelzellen wurden mit Thrombin (1 Unit/ml) stimuliert und nach 0 (d.h. unmittelbar vor Stimulation mit Thrombin), 5, 15, 30 und 60 Minuten lysiert. In der Western Blot Analyse zeichnete sich dabei eine zeitabhängige Inhibition der p70S6K-Phosphorylierung durch Thrombin ab. Nach 30 Minuten erreichte sie ein Minimum von 19% des unstimulierten Anfangswerts und stieg danach wieder an. Die totale p70S6K-

Konzentration blieb wie erwartet unverändert. Nach einstündiger Vorinkubation mit Rapamycin ( $10^{-7}$  mol/l) wurde die p70S6K-Phosphorylierung über den gesamten Zeitverlauf gänzlich gehemmt, unabhängig von der Stimulation mit Thrombin (Abb. 8A). Im Unterschied zu Rapamycin führte Vorinkubation mit FK-506 ( $10^{-7}$  mol/l) weder zu einer Veränderung der thrombin-induzierten Dephosphorylierung noch der basalen Phosphorylierung (Abb. 8B).

Die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) ist ein aktivierendes Upstream-Protein von mTOR [35]. Dessen Inhibierung durch LY294002 ( $5 \times 10^{-6}$  mol/l) und Wortmannin ( $10^{-7}$  mol/l) verhinderte die Phosphorylierung von p70S6K ebenfalls fast vollständig, sowohl mit als auch ohne Thrombin (Abb. 8C).

## 6. Abbildungen und Legenden



*Abb. 4: Rapamycin verstärkt die TF Expression in HAEC*

A) Rapamycin verstärkt konzentrationsabhängig die thrombin-induzierte endotheliale TF Expression. Die Werte sind dargestellt in Prozent der Stimulation mit Thrombin allein. \* $p < 0.0001$ , \*\*  $p < 0.001$  versus Thrombin allein.

B) Rapamycin erhöht die basale TF Expression. Die Werte sind dargestellt in Prozent der unstimulierten Kontrolle. \*  $p < 0.01$  versus unstimulierte Kontrolle.

C) Rapamycin verstärkt konzentrationsabhängig die thrombin-induzierte TF Oberflächenaktivität. Die Werte sind dargestellt in Prozent der Stimulation mit Thrombin allein. \*  $p < 0.01$  versus Thrombin allein.

Die gezeigten Blots sind repräsentativ für mindestens 3 Versuche; alle Blots wurden auf aT ( $\alpha$ -Tubulin) abgeglichen.

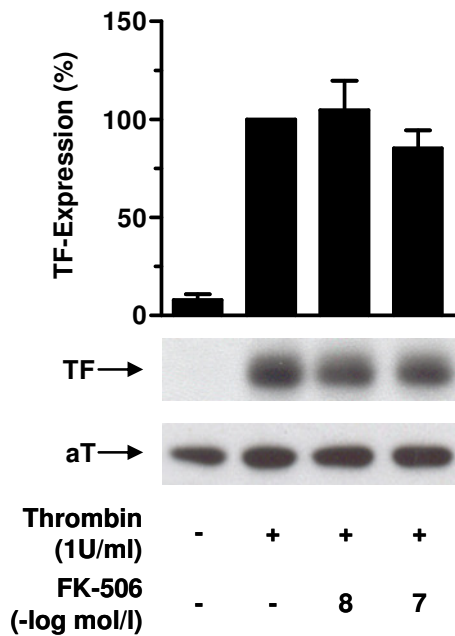


Abb. 5: FK-506 verändert die TF Expression in HAEC nicht

Vorinkubation mit FK-506 führt zu keiner signifikanten Änderung der TF Expression. Die Werte sind dargestellt in Prozent der Stimulation mit Thrombin allein.

Die gezeigten Blots sind repräsentativ für mindestens 5 Versuche; alle Blots sind auf aT abgeglichen.

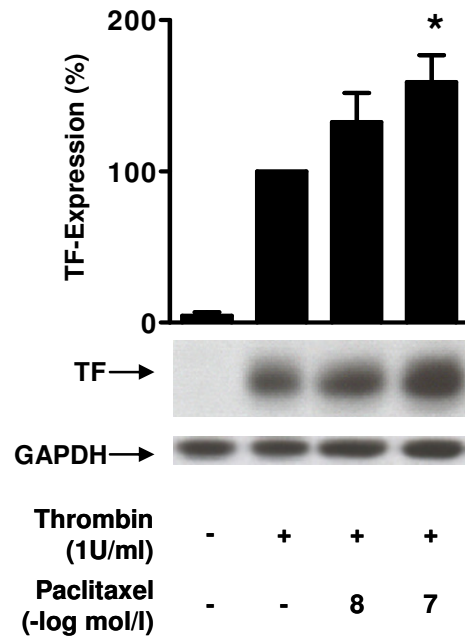


Abb. 6: Paclitaxel verstärkt die TF Expression in HAEC

Paclitaxel erhöht die thrombin-induzierte TF Expression in konzentrationsabhängiger Weise. Die Werte sind dargestellt in Prozent von Thrombin allein. \* $p < 0.04$  versus Thrombin allein.

Die gezeigten Blots sind repräsentativ für mindestens 3 Versuche; alle Blots sind auf GAPDH abgeglichen.

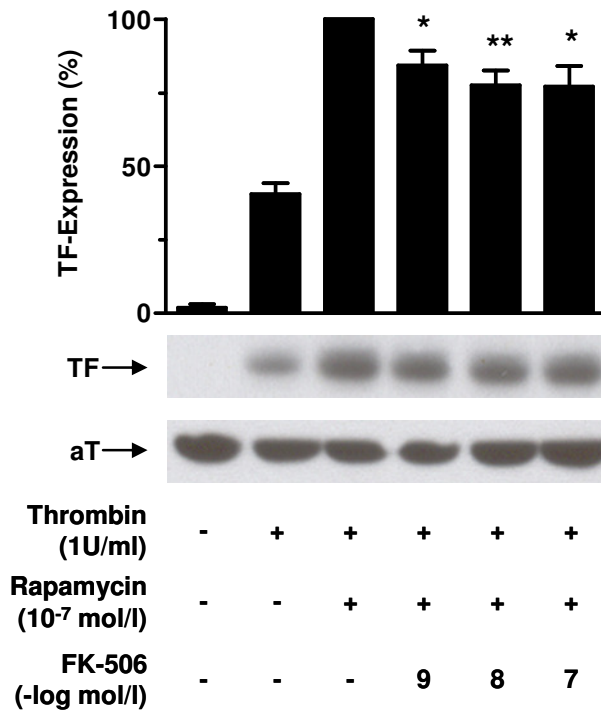


Abb. 7: FK-506 antagonisiert die durch Rapamycin induzierte TF Expression

FK-506 reduziert die durch Rapamycin induzierte TF Expression. Die Werte sind dargestellt in Prozent der durch Thrombin (1 Unit/ml) + Rapamycin ( $10^{-7}$  mol/l) induzierten Expression. \* $p < 0.05$  und \*\* $p < 0.02$  versus Thrombin + Rapamycin.

Die gezeigten Blots sind repräsentativ für mindestens 3 Versuche; alle Blots sind auf aT abgeglichen.

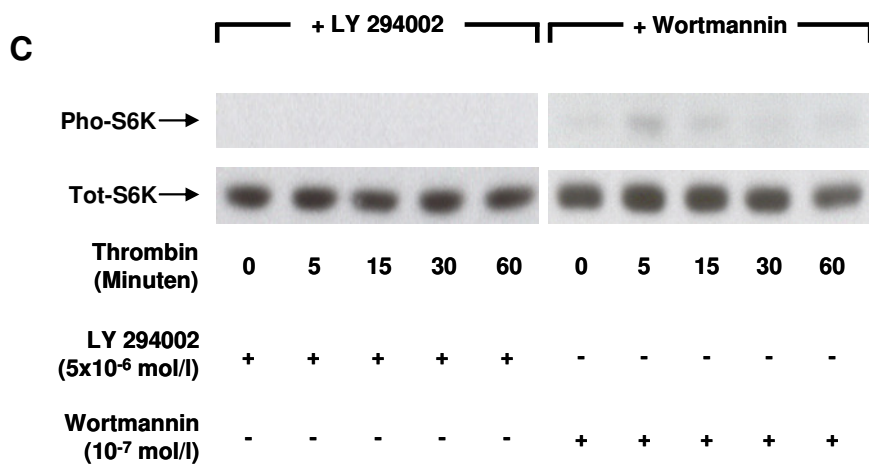
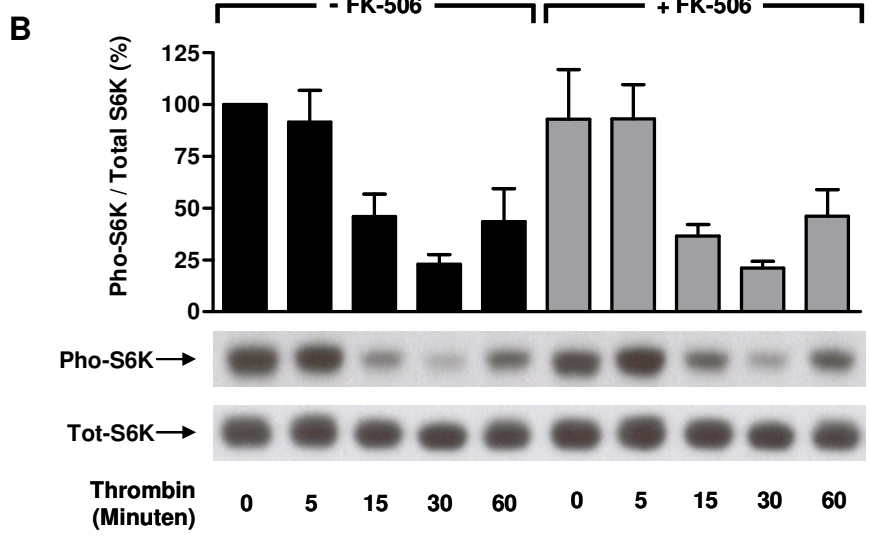
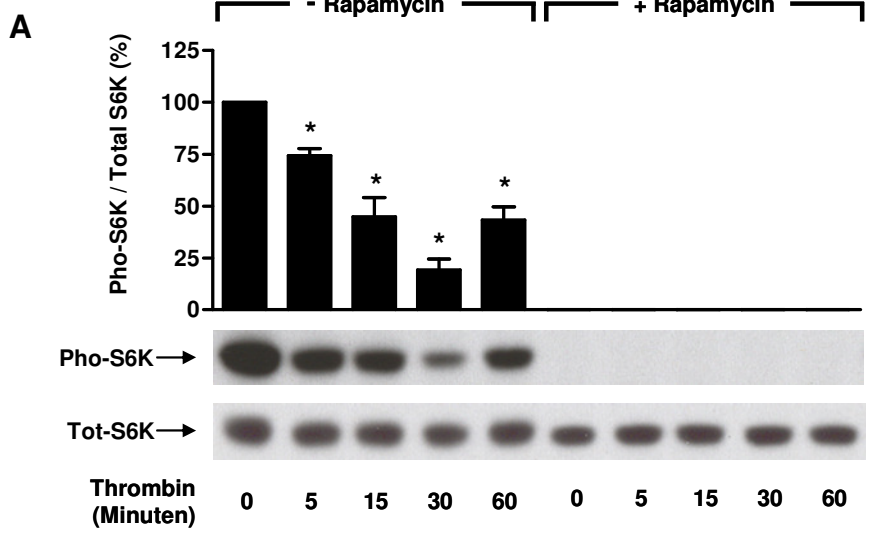


Abb. 8: Rapamycin hemmt die mTOR-Aktivität

A) Thrombin (1 Unit/ml) führt zu einer vorübergehenden Hemmung der p70S6K-Phosphorylierung, während sie durch Rapamycin ( $10^{-7}$  mol/l) vollständig gehemmt wird. Die Expression des totalen p70S6K bleibt unverändert. Die Daten sind dargestellt als Prozent der phosphorylierten p70S6K an der gesamten p70S6K. \* $p < 0.0001$  versus unstimulierte Kontrolle.

B) FK-506 ( $10^{-7}$  mol/l) hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von p70S6K. Die totale p70S6K-Konzentration bleibt gleich. Die Daten sind dargestellt als Prozent der phosphorylierten p70S6K an der gesamten p70S6K.

C) LY294002 ( $5 \times 10^{-6}$  mol/l) und Wortmannin ( $10^{-7}$  mol/l) hemmen beide die Phosphorylierung von p70S6K fast komplett, während die Expression des gesamten Proteins gleich bleibt.

Die gezeigten Blots sind repräsentativ für mindestens 3 Versuche.



## 7. Diskussion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Rapamycin sowohl die Induktion von TF durch Thrombin verstärkt, als auch alleine eine fördernde Wirkung auf dessen Expression ausübt. Ein ähnlicher Effekt wurde mit Paclitaxel beobachtet, während FK-506 keinen Effekt auf die endotheliale TF Expression zeigte. Rapamycin und FK-506 binden kompetitiv an dasselbe intrazelluläre Zielprotein, FKBP-12. Der Rapamycin-FKBP-12-Komplex übt einen inhibitorischen Effekt auf mTOR aus; in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass FK-506 den stimulatorischen Effekt von Rapamycin auf die thrombin-induzierte TF Expression abschwächt. Da bekannt ist, dass Rapamycin und FK-506 um die Bindungsstelle an FKBP-12 kompetieren [37], lässt sich aus diesem Ergebnis schliessen, dass Bindung an FKBP-12 notwendig ist, damit Rapamycin auf die TF Expression wirken kann.

Des Weiteren wurden die intrazellulären Regulationsmechanismen untersucht, die zur Verstärkung der thrombin-induzierten TF Expression durch Rapamycin führen. Rapamycin wirkt inhibierend auf mTOR, welches verantwortlich ist für die Phosphorylierung von 4EBP1 (eukariontischer Initiationsfaktor 4E-Bindungsprotein) und p70S6K, welche entscheidende Schritte der Proteintranslation regulieren [35, 36]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Phosphorylierung von p70S6K als Mass für die Aktivität von mTOR verwendet. Es überraschte nicht, dass Rapamycin zur praktisch kompletten Dephosphorylierung von p70S6K führte, unabhängig von einer Stimulation mit Thrombin. Auch die Inhibition der PI3K durch LY294002 oder Wortmannin hemmte die mTOR Aktivität praktisch vollständig. PI3K ist ein bekannter upstream Regulator von mTOR und kann in Abhängigkeit von verschiedensten Wachstumsfaktoren (z.B Insulin) über mehrere Zwischenschritte mTOR aktivieren [35]. Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von PI3K die thrombin-induzierte TF Expression [38, 39], sowie die Induktion von TF durch andere Wachstumsfaktoren wie VEGF erhöht [40]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine zeitabhängige, vorübergehende Dephosphorylierung von p70S6K in den mit Thrombin stimulierten Zellen nachgewiesen, welches eine transiente Inhibition von mTOR durch Thrombin nahelegt. Dies und der hemmende Einfluss der PI3K auf die TF Expression lassen darauf schliessen, dass mTOR im

intrazellulären Signaltransduktionsweg der TF Induktion durch Thrombin integriert ist und hemmend auf dessen Expression wirkt.

Paclitaxel bewirkte ebenfalls eine Verstärkung der thrombin-induzierten TF Expression, obgleich weniger potent als Rapamycin. Der Wirkmechanismus von Paclitaxel ist grundlegend verschieden verglichen mit dem von Rapamycin und FK-506. Es bindet an Mikrotubuli des mitotischen Spindelapparats und lässt sie erstarren [23]. Die Regulation der Mikrotubuli-Dynamik während der Mitose wird begleitet von Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen. Deshalb überrascht es auch nicht, dass während der mitotischen Zell-Arretierung verschiedene Kinasen aktiviert werden [23]. In der Tat konnte eine Studie zeigen, dass auch Paclitaxel p70S6K in seiner Aktivität hemmen kann, wenn auch durch Phosphorylierung anderer Aminosäuren als jener, die in der vorliegenden Arbeit zur Aktivitätsbestimmung von mTOR gemessen wurde, nämlich Threonin 421 und Serin 424 [41]. Offenbar sind mTOR und PI3K auch in diesen Signalweg integriert, da deren Hemmung die Phosphorylierung an Threonin 421 und Serin 424 von p70S6K verhinderte [41]. Ausserdem dephosphorylierte Paclitaxel Akt [41], welches als negativer Regulator auf die TF Expression angesehen wird [38], was auch eine Erklärung für die Verstärkung der TF Induktion durch Paclitaxel sein könnte.

Den Befunden der vorliegenden Studie könnte eine wichtige klinische Bedeutung zukommen, da Rapamycin und Paclitaxel durch Induktion von TF und nachfolgende Aktivierung des Gerinnungssystems an der Entstehung von Thrombosen in DES beteiligt sein könnten. Die Konzentrationen von Rapamycin, die in diesen Experimenten verwendet wurden, korrelieren gut mit denen in vivo, da beispielsweise nach Implantation von 2 Rapamycin freisetzenden Stents systemische Konzentrationen von ungefähr 1ng/ml (ca.  $1.15 \times 10^{-9}$  mol/l) gemessen wurden [42]. Die lokale Konzentration in der Gefässwand dürfte erheblich darüber liegen, nicht zuletzt aufgrund der lipophilen Eigenschaft von Rapamycin, welche zu einer chronischen Anreicherung in der Gefässwand führen kann [15, 43, 44]. Nach Implantation eines Paclitaxel-freisetzenden Stents konnten keine systemische Konzentrationen gemessen werden [45]. Ähnlich wie Rapamycin ist jedoch auch Paclitaxel sehr lipophil und akkumuliert in der Gefässwand [46, 47]. Damit die Medikamente überhaupt eine Wirkung auf Endothelzellen haben können, muss die Reendothelisation, also die Wiederherstellung des bei der Stent-

Platzierung beschädigten Endothels, bereits begonnen haben. Tiermodelle zeigten, dass dieser Vorgang schon 2 Tage nach Gefäßverletzung durch Ballon-Dilatation einsetzt [48]. Bei histologischen Analysen von menschlichen Arterien wurde Reendothelisation zwischen 14 und 90 Tagen nach Stentimplantation beobachtet [49, 50]. Die vorliegenden Daten könnten somit insbesondere bedeutsam sein für die Entwicklung von subakuten (<30 Tage) Stent-Thrombosen. Die Freisetzung des Medikaments hängt entscheidend vom Material des Stents ab. Rapamycin freisetzende Stents sind so konzipiert, dass sie ungefähr 80% Prozent des Medikaments innert 30 Tagen freigesetzt haben [10, 11]. Die Freisetzungskinetik der Paclitaxel-Stents ist in zwei verschiedenen Release-Modellen unterschiedlich; schnell freisetzende Stents eluieren das meiste Paclitaxel in der ersten 2 Tagen, während bei langsameren Freisetzung-Modellen die Substanz während den ersten 15 – 20 Tagen freigesetzt wird [51]. 75% des Paclitaxels bei ersteren und 90% bei letzteren Stents verbleibt jedoch im Stent [47]. Wie lange das Medikament in der Gefäßwand wirkt, ist schwierig zu sagen. Wahrscheinlich wirkt es jedoch länger, als die Freisetzungsphase dauert, da die Neointimaproliferation, die normalerweise länger als 30 Tage dauert [4], von den Medikamenten gehemmt wird. Die akuten und subakuten In-Stent-Thrombosen in DES, von denen über mehrere hundert Fälle berichtet wurde [25], ereignen sich innert 30 Tagen nach Implantation. In dieser Zeit hat die Reendothelisation bereits begonnen, und Rapamycin, ebenso wie (je nach Art des Stents) Paclitaxel wird immer noch freigesetzt. Daher erscheint es durchaus möglich, dass die TF-induzierende Eigenschaft von Rapamycin und Paclitaxel hierzu beitragen. Darüber hinaus wurde von Stent-Thrombosen berichtet, die sich spät nach Implantation von Rapamycin- und Paclitaxel freisetzenden Stents ereigneten, und die meist nach Absetzen von Plättchenaggregationshemmern geschahen [26]. Die Anwendung von Plättchenaggregationshemmern wie Clopidogrel nach Stentimplantation ist von entscheidender Bedeutung, weil die Aktivierung der Blutplättchen eine wichtige Rolle in der Thrombusbildung spielt. Die Verwendung dieser Medikamenten hat die Inzidenz von In-Stent-Thrombosen vermindert [52], wohingegen das Absetzen dieser Therapie die Thrombus-Bildung zu begünstigen scheint [26]. In der Tat konnte gezeigt werden, dass Clopidogrel darüber hinaus die Freisetzung von TF durch aggregierende Plättchen hemmt [53]. Höchstwahrscheinlich ist die konsequente Therapie mit

Plättchenaggregationshemmern nach Stent-Implantationen dafür verantwortlich, dass in den Rapamycin- oder Paclitaxel freisetzenden Stents die Thromboserate nicht höher ist als in unbeschichteten Metallstents.

Es wäre ebenfalls möglich, dass Rapamycin oder Paclitaxel distal des implantierten Stents das Endothel beeinflussen, und dort die Thrombusbildung begünstigen könnten. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Rapamycin-freisetzende Stents im Vergleich zu unbeschichteten Stents distal der Implantationsstelle zu endothelialer Dysfunktion führen [54]. Somit könnte die TF Expression auch in diesen Arealen gesteigert sein.

Ausserdem spielt TF auch eine entscheidende Rolle bei der Atherosklerose: in Plaques konnte eine Überexpression von TF in Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Monozyten und Schaumzellen gezeigt werden [31]. Es wird diskutiert, dass TF eine Rolle bei der Plaqueruptur spielen, und somit einer der Auslöser für thrombotische Verschlüsse der atherosklerotischen Gefässe sein könnte. In der Tat wurden bei Patienten mit instabiler Angina Pectoris oder Herzinfarkt erhöhte Werte von TF im Blut gemessen [31]. Auch bei der Entwicklung der Restenose nach PTCA scheint TF beteiligt zu sein, da bei Patienten, die eine Restenose entwickelten, höhere Tissue Factor Aktivität im Blut gemessen wurde [55, 56]. Tatsächlich induziert TF die Migration von glatten Muskelzellen, welche ein Schlüsselereignis der Restenose darstellt [57]. Eine mögliche pro-migratorische Wirkung des durch Rapamycin induzierten Tissue Faktors würde jedoch höchstwahrscheinlich durch die potente anti-migratorische Wirkung von Rapamycin selber überlagert.

Da FK-506 die TF Expression nicht beeinflusste, wäre die Gefahr einer In-Stent-Thrombose eventuell gegenüber den Rapamycin freisetzenden Stents vermindert. Vergleichende Studien hierüber liegen zum gegenwärtigen Zeitpunkt jedoch nicht vor. Ausserdem wirkt FK-506 weniger stark hemmend auf die Endothelzellproliferation als Rapamycin, was die Reendothelisation beschleunigen könnte [22, 58]. In der Tat stellt die verzögerte Reendothelisation ebenfalls einen wichtigen Risikofaktor für Stent-Thrombosen dar, da in diesem Fall das thrombogene subepitheliale Gewebe länger den Gerinnungsfaktoren im Blut exponiert ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Rapamycin und Paclitaxel die thrombin-induzierte TF Expression verstärkt; die Wirkung von Rapamycin geschieht via

Hemmung von mTOR. FK-506, welches alleine keine Wirkung zeigt, kann diesen Effekt von Rapamycin partiell antagonisieren; dies impliziert, dass Bindung von Rapamycin an mTOR notwendig ist, um seinen Effekt auf die TF Expression auszuüben. Die Beobachtung ist von grosser klinischer Bedeutung, da die Induktion von TF durch Rapamycin und Paclitaxel die Entstehung von In-Stent-Thrombosen in DES begünstigen könnte.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Brophy, J.M., P. Belisle, and L. Joseph, *Evidence for use of coronary stents. A hierarchical bayesian meta-analysis*. Ann Intern Med, 2003. **138**(10): p. 777-86.
2. Schomig, A., et al., *Coronary stenting plus platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade compared with tissue plasminogen activator in acute myocardial infarction. Stent versus Thrombolysis for Occluded Coronary Arteries in Patients with Acute Myocardial Infarction Study Investigators*. N Engl J Med, 2000. **343**(6): p. 385-91.
3. Babapulle, M.N., et al., *A hierarchical Bayesian meta-analysis of randomised clinical trials of drug-eluting stents*. Lancet, 2004. **364**(9434): p. 583-91.
4. Grewe, P.H., et al., *Acute and chronic tissue response to coronary stent implantation: pathologic findings in human specimen*. J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(1): p. 157-63.
5. Farb, A., et al., *Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans*. Circulation, 1999. **99**(1): p. 44-52.
6. Hoffmann, R., et al., *Patterns and mechanisms of in-stent restenosis. A serial intravascular ultrasound study*. Circulation, 1996. **94**(6): p. 1247-54.
7. Serruys, P.W., et al., *A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group*. N Engl J Med, 1994. **331**(8): p. 489-95.
8. Fischman, D.L., et al., *A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators*. N Engl J Med, 1994. **331**(8): p. 496-501.
9. Grines, C.L., et al., *Coronary angioplasty with or without stent implantation for acute myocardial infarction. Stent Primary Angioplasty in Myocardial Infarction Study Group*. N Engl J Med, 1999. **341**(26): p. 1949-56.
10. Morice, M.C., et al., *A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization*. N Engl J Med, 2002. **346**(23): p. 1773-80.
11. Moses, J.W., et al., *Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery*. N Engl J Med, 2003. **349**(14): p. 1315-23.

12. Stone, G.W., et al., *A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease*. N Engl J Med, 2004. **350**(3): p. 221-31.
13. Bartorelli, A.L., et al., *Synergy of passive coating and targeted drug delivery: the tacrolimus-eluting Janus CarboStent*. J Interv Cardiol, 2003. **16**(6): p. 499-505.
14. Kollum, M., et al., *Particle debris from a nanoporous stent coating obscures potential antiproliferative effects of tacrolimus-eluting stents in a porcine model of restenosis*. Catheter Cardiovasc Interv, 2005. **64**(1): p. 85-90.
15. Gummert, J.F., T. Ikonen, and R.E. Morris, *Newer immunosuppressive drugs: a review*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(6): p. 1366-80.
16. Marx, S.O., et al., *Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 1995. **76**(3): p. 412-7.
17. Gallo, R., et al., *Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle*. Circulation, 1999. **99**(16): p. 2164-70.
18. Poon, M., et al., *Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration*. J Clin Invest, 1996. **98**(10): p. 2277-83.
19. Sakakibara, K., et al., *Rapamycin inhibits fibronectin-induced migration of the human arterial smooth muscle line (E47) through the mammalian target of rapamycin (mTOR)*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005.
20. Spencer, C.M., K.L. Goa, and J.C. Gillis, *Tacrolimus. An update of its pharmacology and clinical efficacy in the management of organ transplantation*. Drugs, 1997. **54**(6): p. 925-75.
21. Mohacsi, P.J., et al., *Different inhibitory effects of immunosuppressive drugs on human and rat aortic smooth muscle and endothelial cell proliferation stimulated by platelet-derived growth factor or endothelial cell growth factor*. J Heart Lung Transplant, 1997. **16**(5): p. 484-92.
22. Matter, C., et al., *Tacrolimus, but not sirolimus targets human vascular smooth muscle cells, but spares endothelial cells - Implications for drug-eluting stents*. Abstract. Eur Heart J, 2002. **4**(Supplement): p. 143 (869).
23. Blagosklonny, M.V. and T. Fojo, *Molecular effects of paclitaxel: myths and reality (a critical review)*. Int J Cancer, 1999. **83**(2): p. 151-6.

24. Wiskirchen, J., et al., *The effects of paclitaxel on the three phases of restenosis: smooth muscle cell proliferation, migration, and matrix formation: an in vitro study*. Invest Radiol, 2004. **39**(9): p. 565-71.
25. *FDA advises physicians of adverse events associated with Cordis Cypher coronary stents*. US Food and Drug Administration Public Health Web Notification. October 29 2003: p. T03-T71.
26. McFadden, E.P., et al., *Late thrombosis in drug-eluting coronary stents after discontinuation of antiplatelet therapy*. Lancet, 2004. **364**(9444): p. 1519-21.
27. Lee, C.H., et al., *Late thrombotic occlusion of paclitaxel eluting stent more than one year after stent implantation*. Heart, 2004. **90**(12): p. 1482.
28. Liistro, F. and A. Colombo, *Late acute thrombosis after paclitaxel eluting stent implantation*. Heart, 2001. **86**(3): p. 262-4.
29. Kereiakes, D.J., et al., *Thrombosis and drug-eluting stents: a critical appraisal*. Rev Cardiovasc Med, 2004. **5**(1): p. 9-15.
30. Jeremias, A., et al., *Stent thrombosis after successful sirolimus-eluting stent implantation*. Circulation, 2004. **109**(16): p. 1930-2.
31. Moons, A.H., M. Levi, and R.J. Peters, *Tissue factor and coronary artery disease*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(2): p. 313-25.
32. Mackman, N., *Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(6): p. 1015-22.
33. Archipoff, G., et al., *Heterogeneous regulation of constitutive thrombomodulin or inducible tissue-factor activities on the surface of human saphenous-vein endothelial cells in culture following stimulation by interleukin-1, tumour necrosis factor, thrombin or phorbol ester*. Biochem J, 1991. **273 (Pt 3)**: p. 679-84.
34. Steffel, J., et al., *Histamine induces tissue factor expression: implications for acute coronary syndromes*. Circulation, 2005. **112**(3): p. 341-9.
35. Hay, N. and N. Sonenberg, *Upstream and downstream of mTOR*. Genes Dev, 2004. **18**(16): p. 1926-45.
36. Burnett, P.E., et al., *RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(4): p. 1432-7.



37. Bierer, B.E., et al., *Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(23): p. 9231-5.
38. Eto, M., et al., *Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways*. Circulation, 2002. **105**(15): p. 1756-9.
39. Viswambharan, H., et al., *Reconstituted high-density lipoprotein inhibits thrombin-induced endothelial tissue factor expression through inhibition of RhoA and stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase but not Akt/endothelial nitric oxide synthase*. Circ Res, 2004. **94**(7): p. 918-25.
40. Blum, S., et al., *An inhibitory role of the phosphatidylinositol 3-kinase-signaling pathway in vascular endothelial growth factor-induced tissue factor expression*. J Biol Chem, 2001. **276**(36): p. 33428-34.
41. Le, X.F., et al., *Paclitaxel induces inactivation of p70 S6 kinase and phosphorylation of Thr421 and Ser424 via multiple signaling pathways in mitosis*. Oncogene, 2003. **22**(4): p. 484-97.
42. U. S. Food and Drug Administration. Center for Device and Radiological Health. *Cypher Sirolimus-eluting coronary stent on RAPTOR over-the-wire delivery system or RAPTORRAIL rapid exchange delivery system*. Available at: <http://www.fda.gov/cdrh/pdf2/p020026.html> [cited.
43. Klugherz, B.D., et al., *Twenty-eight-day efficacy and pharmacokinetics of the sirolimus-eluting stent*. Coron Artery Dis, 2002. **13**(3): p. 183-8.
44. Suzuki, T., et al., *Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model*. Circulation, 2001. **104**(10): p. 1188-93.
45. U. S. Drug and Food Administration. Center for Devices and Radiological Health. *TAXUS Express paclitaxel-eluting coronary artery stent system (Monorail and over-the-wire) -P030025*. Available at: <http://www.fda.gov/cdrh/pdf3/P030025c.pdf> [cited.
46. Creel, C.J., M.A. Lovich, and E.R. Edelman, *Arterial paclitaxel distribution and deposition*. Circ Res, 2000. **86**(8): p. 879-84.
47. Halkin, A. and G.W. Stone, *Polymer-based paclitaxel-eluting stents in percutaneous coronary intervention: a review of the TAXUS trials*. J Interv Cardiol, 2004. **17**(5): p. 271-82.

48. Tanaka, H., et al., *Sustained activation of vascular cells and leukocytes in the rabbit aorta after balloon injury*. *Circulation*, 1993. **88**(4 Pt 1): p. 1788-803.
49. Anderson, P.G., et al., *Vascular pathology of balloon-expandable flexible coil stents in humans*. *J Am Coll Cardiol*, 1992. **19**(2): p. 372-81.
50. Schwartz, R.S., N.A. Chronos, and R. Virmani, *Preclinical restenosis models and drug-eluting stents: still important, still much to learn*. *J Am Coll Cardiol*, 2004. **44**(7): p. 1373-85.
51. Chieffo, A. and A. Colombo, *Polymer-based paclitaxel-eluting coronary stents. Clinical results in de novo lesions*. *Herz*, 2004. **29**(2): p. 147-51.
52. Leon, M.B., et al., *A clinical trial comparing three antithrombotic-drug regimens after coronary-artery stenting. Stent Anticoagulation Restenosis Study Investigators*. *N Engl J Med*, 1998. **339**(23): p. 1665-71.
53. Leon, C., et al., *Platelet ADP receptors contribute to the initiation of intravascular coagulation*. *Blood*, 2004. **103**(2): p. 594-600.
54. Hofma, S., et al., *Prolonged endothelial dysfunction late after stenting with sirolimus-eluting stent compared to bare metal stent. Abstract*. *Eur Heart J*, 2004. **25**(Supplement): p. 525 (P3074).
55. Mizuno, O., et al., *Tissue factor expression in coronary circulation as a prognostic factor for late restenosis after coronary angioplasty*. *Cardiology*, 2001. **95**(2): p. 84-9.
56. Tutar, E., et al., *Elevated whole-blood tissue factor procoagulant activity as a marker of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty and stent implantation*. *Circulation*, 2003. **108**(13): p. 1581-4.
57. Sato, Y., et al., *Tissue factor induces migration of cultured aortic smooth muscle cells*. *Thromb Haemost*, 1996. **75**(3): p. 389-92.
58. Steffel, J., et al., *Rapamycin, but not FK-506, increases endothelial tissue factor expression: implications for drug-eluting stent design*. *Circulation*, 2005. **112**(13): p. 2002-11.

## **9. Verdankungen**

Ich danke Dr. med. Jan Steffel für die genaue Einführung in die Methoden und die sehr gute Betreuung während der Durchführung der Experimente und des Schreibens der Arbeit, sowie Prof. Dr. med. Felix Tanner für die professionelle Supervision. Ausserdem möchte ich meinen Eltern für Ihre Unterstützung danken und dass sie mir das Studium ermöglichen.

## 10. Curriculum Vitae

Name: Zimmermann

Vorname: Dorothee

Geburtsdatum: 28.6.1981

Geburtsort: Niederbipp BE

Bürgerort: Adelboden BE

Primarschule: 1988-1994 in Niederbipp bzw. Luzern

Gymnasium: 1994-2001 in Luzern

Matura-Typ: B

Medizinstudium: 2001 – 2007 an der Universität Zürich

Staatsexamen: 10/2007 an der Universität Zürich

Stelle als Assistenzärztin

Chirurgie: ab Januar 2008 in Wolhusen LU