

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1: Einleitung

1.1. Sepsis	19
1.1.1. Geschichte der Sepsis.....	19
1.1.2. Definition der Sepsis.....	21
1.1.3. Pathogenese der Sepsis	22
1.1.4. Inzidenz der Sepsis.....	25
1.1.5. Therapie der Sepsis	25
 1.2. Aktiviertes Protein C	 27
1.2.1. Antikoagulatorische Wirkung von APC	28
1.2.2. Profibrinolytische Wirkung von APC.....	31
1.2.3. Indirekte und direkte anti-inflammatorische Wirkung von APC.....	32
1.2.4. Antiapoptotische Wirkmechanismen von APC	34
1.2.5. Rezeptoren für APC.....	35
1.2.6. APC in der Behandlung der Sepsis	36
 1.3. Fractalkine.....	 37
 1.4. Transforming Growth Factor β2.....	 40
 1.5. Cyclooxygenase-2	 42
 1.6. Fragestellung der wissenschaftlichen Arbeit.....	 44

Kapitel 2: Material und Methoden

2.1. Zellkultur	45
2.1.1. Humane Endothelzellen aus der Vena umbilicalis (HUVEC)	
– Anlegen einer Primärkultur.....	45
2.1.2. Kultivieren und Passagieren von Endothelzellen.....	46
2.1.3. Durchführen der HUVEC-Experimente.....	46
2.2. Affymetrix® GeneChip Expressions Array.....	48
2.2.1. Isolierung von Gesamt-RNA	49
2.2.2. Synthese doppelsträngiger cDNA	50
2.2.3. Aufreinigung von ds-cDNA	50
2.2.4. Synthese Biotin-markierter cRNA durch In-Vitro-Transkription (IVT)	51
2.2.5. Aufreinigung von cRNA	51
2.2.6. Fragmentierung von Biotin-markierter cRNA	51
2.2.7. Hybridisierung der Proben mit dem Array	52
2.2.8. Waschen und Markieren der Array-Chips	52
2.2.9. Scannen der Array-Chips und Auswertung	52
2.3. Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (rtPCR).....	55
2.3.1. Isolierung von Gesamt-RNA	55
2.3.2. Reverse Transkription	55
2.3.3. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	56
2.3.4. Gelelektrophorese.....	58
2.3.5. Densitometrie	59

2.4.	Enzym-linked immunosorbent assay (ELISA).....	60
2.4.1.	Fractalkine Immunoassay	62
2.4.2.	Transforming Growth Factor- β 2 Immunoassay.....	62
2.4.3.	6-keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$ Immunoassay	63
2.5.	Colorimetrischer mRNA-Quantifizierungs-Assay.....	64
2.6.	Western Blot	65
2.6.1.	Vorbereitung der Zellen und Zellernte.....	65
2.6.2.	Vorbereitung der Proben	66
2.6.3.	Proteinbestimmung	66
2.6.4.	Durchführung des Western Blots	67
2.7.	Material.....	69
2.7.1.	Kulturmedium	69
2.7.2.	Substanzen, Reagenzien und Chemikalien	69
2.7.3.	Plastikwaren und Glaswaren	72
2.7.4.	mRNA-Präparation	73
2.7.5.	Affymetrix® GeneChip Expressions Array.....	73
2.7.6.	Elisa-Kits.....	74
2.7.7.	Colorimetrischer mRNA-Quantifizierungs-Assay.....	74
2.7.8.	Western Blot	75
2.7.9.	Geräte	75
2.7.10.	Computerprogramme	76
2.7.11.	Statistik.....	77

Kapitel 3: Ergebnisse

3.1. Zellmorphologie von HUVEC.....	78
3.2. Affymetrix® GeneChip Expressions Array.....	79
3.3. Fractalkine.....	81
3.3.1. Wirkung von rhAPC auf die Fractalkine-mRNA-Expression	81
3.3.2. Wirkung von rhAPC auf die endotheliale Fractalkine-Freisetzung.....	83
3.3.2.1. Dosisabhängigkeit.....	83
3.3.2.2. Zeitabhängigkeit.....	84
3.3.3. Wirkung von Protein C auf die endotheliale Fractalkine-Freisetzung.....	86
3.3.4. Untersuchungen zur Beteiligung des Protease aktivierbaren Rezeptors-1 (PAR-1).....	87
3.3.4.1. Aktivierung des Protease-aktivierbaren Rezeptors-1 mittels PAR-1-Agonist.....	87
3.3.4.2. Wirkung von PAR-1- und PAR-2 Antagonisten auf die Fractalkine-Freisetzung.....	88
3.4. Transforming Growth Factor-β2	90
3.4.1. Wirkung von rhAPC auf die Transforming Growth Factor- β 2- mRNA-Expression	90
3.4.2. Wirkung von rhAPC auf die Synthese von Transforming Growth Factor- β 2 ..	92

3.5. Cyclooxygenase-2	93
3.5.1. Wirkung von rhAPC auf die Cyclooxygenase-2-mRNA-Expression.....	93
3.5.1.1. Dosisabhängigkeit.....	93
3.5.1.2. Zeitabhängigkeit.....	94
3.5.2. Wirkung von rhAPC auf die Synthese von Cyclooxygenase-2-Protein	96
3.5.3. Wirkung von rhAPC auf die 6-keto-PGF- $_{1\alpha}$ -Freisetzung	97
3.5.4. Wirkung von Protein C auf die Cyclooxygenase-2-mRNA-Expression	98
3.5.5. Wirkung von Protein C auf die 6-keto-PGF- $_{1\alpha}$ -Freisetzung	100
3.5.6. Wirkung von Protein C und APC auf die Cyclooxygenase-1-Expression.....	101
3.5.7. Wirkung von NS-398 auf die 6-keto-PGF- $_{1\alpha}$ -Freisetzung	102
3.5.8. Wirkung von Prostaglandin H ₂ auf die 6-keto-PGF- $_{1\alpha}$ -Freisetzung	103

Kapitel VI: Diskussion

4.1. Anmerkungen zur Zellvitalität	105
4.2. Affymetrix® GeneChip Array	105
4.3. Fractalkine.....	107
4.4. Transforming Growth Factor-β2	111
4.5. Cyclooxygenase-2	113

Kapitel V: Zusammenfassung

5.	Zusammenfassung.....	117
----	----------------------	-----

Kapitel VI: Summary

6.	Summary.....	119
----	--------------	-----

Kapitel VII: Literaturverzeichnis

7.	Literaturverzeichnis.....	121
----	---------------------------	-----

Kapitel VIII: Anhang

8.1.	Eigene Veröffentlichungen	139
8.2.	Danksagung.....	143
8.3.	Eidesstattliche Erklärung	145