Expression des Zelloberflächenrezeptors für Thrombin, Thrombomodulin, in humanen Ovarialkarzinomzellen

S.		Wilhelm ^b
O.		Wilhelm ^b
M.		Schmitt ^b
V.		Möbus ^a
R.		Kreienberg ^a
H.		Graeff ^b

^bFrauenklinik der TU München ^aFrauenklinik der Univers. Ulm

Dipl. Biol. S. Wilhelm, Frauenklinik der TU, Ismaningerstraße 22, D-81675 München

Thrombomodulin ist ein transmembraner Rezeptor, welcher einen 1:1 Komplex mit Thrombin eingeht [1]. Dieser Thrombomodulin/Thrombin Komplex aktiviert das Zymogen Protein C. Durch die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin, hierdurch wird die Tertiärstruktur von Thrombin verändert [2], werden die pro-koagulant Funktionen von Thrombin, wie die Aktivierung von Faktor V und VIII und die Gerinnung von Fibrinogen, inhibiert [3]. Desweiteren wird in Anwesenheit von Thrombomodulin die Inaktivierung des Plasminogenaktivators vom Urokinasetyp durch Thrombin beschleunigt [4]. Die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin induziert die Internalisierung des Thrombin/Thrombomodulin Komplexes [5].

Die extrazelluläre Matrix (Tumorstroma) des humanen Ovarialkarzinoms besteht aus Fibrin/Fibronectin [6]. Mittels N-terminaler Aminosäuresequenzierung konnte gezeigt werden, daß die in den Aszites abgegebenen Fibrin/Fibronectinabbauprodukte Thrombinspaltstellen aufweisen [7]. Dies läßt die Schlußfolgerung zu, daß der Aufbau der Fibrin/Fibronectin-Gelmatrix durch Thrombin bewirkt wurde. Ein regulatorischer Mechanismus für die Serinprotease Thrombin im Ovarialkarzinom ist bisher noch nicht bekannt. Daher richteten sich unsere Untersuchungen darauf zu evaluieren, ob der Zelloberflächenrezeptor für Thrombin, Thrombomodulin, in humanen Ovarialkarzinomzellen exprimiert wird und für die Regulation des Enzyms Thrombin verantwortlich sein könnte.

Ergebnisse

Sechs verschiedene Tumorzelllinien etabliert aus dem Primärtumor von Patientinnen mit Zystadenokarzinom des Ovars wurden auf die Expression von Thrombomodulin getestet. Mit Hilfe von zwei monoklonalen Antikörpern (die monoklonalen Antikörper wurden freundlicherweise von Dr. J. Parkinson, Berlex Biosciences, San Francisco, USA, zur Verfügung gestellt), die verschiedene Epitope des Thrombomodulinmoleküls erkennen, zeigten durchflußzytofluorometrische Untersuchungen, daß alle Karzinomzelllinien Thrombomodulin in unterschiedlichem Maße exprimieren (Abb. 1). Die Bindung der monoklonalen Antikörper an zellgebundenes Thrombomodulin ist spezifisch, denn lösliches, rekombinantes Thrombomodulin vermag deren Bindung kompetitiv zu inhibieren (Abb. 2). Die Fähigkeit der Tumorzellen Protein C mittels exprimiertem Thrombomodulin zu aktivieren

konnte durch einen chromogenen Assay in alien Zelllinien nachgewiesen werden (Abb. 3). Die Protein C Aktivierung kann durch monoklonale Antikörper, die gegen Thrombomodulin gerichtet sind, inhibiert werden (Abb. 4). Ein hochsensitiver ELISA erlaubte die Quantifizierung von Thrombomodulin im TritonX-100 Zellextrakt der Tumorzellen. Thrombomodulin konnte ebenfalls immunhistochemisch auf den Ovarialkarzinomzelllinien dargestellt werden. Hierzu wurden Zyto-spins der Zelllinien angefertigt und die Bindung des monoklonalen Antikörpers mit der APAAP Färbemethode detektiert. Konfokale Laserscanmikroskopie zeigt die Expression von Thrombomodulin auf der Zelloberfläche der Tumorzellen. Thrombomodulin wird durch noch nicht völlig aufgeklärte Mechanismen in löslicher Form von der Endothelzelloberfläche in das Plasma abgegeben. Diese lösliche Form des Thrombomodulins ist im Aszites von Patientinnen mit Ovarialkarzinom in 4fach höherer Konzentration als im Plasma nachweisbar.

Zusammenfassung

Humane Ovarialkarzinomzellen exprimieren den Zelloberflächenrezeptor für Thrombin, Thrombomodulin, in funktioneller, aktiver Form. Dies konnte mittels Durchflußzytofluorometrie, ELISA, Immunhistochemie, Protein C Aktivierungsassay und konfokaler Laserscanmikroskopie nachgewiesen werden. In welchem Zusammenhang steht nun die Expression von Thrombomodulin mit dem tumorassoziierten, fibrinolytischen und koagulativen Enzym-system des Ovarialkarzinoms? Urokinase wird von der Tumorzelle sezerniert und bindet an einen spezifischen Oberflächenrezeptor, den Urokinaserezeptor, mit hoher Affinität. Zelloberflächen-gebundene Urokinase aktiviert zelloberflächengebundenes Lasmi-nogen zu Plasmin, welches die Fibrin/Fibronectin-Gelmatrix abbaut. Thrombin ist am Aufbau dieser Matrix beteiligt, gebunden an Thrombomodulin inaktiviert der Thrombin/Thrombomodulin-Kom-plex Urokinase und greift somit als regulatorisches Element in die tumorassoziierte Proteolyse ein.

Abb. 1
lösliches Thrombomodulin (×-facher Überschuß)
Abb. 2

Abb. 3
Kontrolle + Moab + Moab 43B 531

Abb. 1. Detektion von Thrombomodulin auf Ovarial-karzinomzellen mittels Durchflußzytofluorometrie (rel. Fluoreszenzintensität, mean channel).

Abb. 2. Inhibierung der Bindung des monoklonalen Anti-körpers 531 an die Tumorzelle durch lösliches, rekombinantes Thrombomodulin.

Abb. 3. Protein C Aktivierungskapazität der Karzinomzelllinien. Abb. 4. Inhibierung der durch Thrombomodulin vermittelten Protein C Aktivierung durch monoklonale Antikörper.

Literatur

Dittman WA and Majerus PW: Structure and Function of Thrombomodulin: A Natural Anticoagulant. Blood, Vol. 75 (2): 329–336, 1990. Ye J. Esmon NL. Esmon CT, Johnson AE:

The Active Site of Thrombin Is Altered upon Binding to Thrombomodulin. *J. Biol. Chem.* Vol. 266, 23016–23021, 1991. Esmon CT: The Roles of Protein C and Thrombomodulin in the Regulation of Blood Coagulation. *J. Biol. Chem.* Vol. 264, 4743–4746, 1989.

de Munk GAW, Groeneveld E, Rijken DC: Acceleration of the Thrombin Inactivation of Single Chain Urokinase-type Plasminogen Activator (Pro-Urokinase) by Thrombomodulin. *J. Clin. Invest.* Vol. 88, 1680–1684, 1991. Maruyama I, Majerus PW: The Turnover of Thrombin-Thrombomodulin Complex in Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells and A549 Lung Cells. *J. Biol. Chem.* Vol. 260, 15432–15438, 1985. Wilhelm O, Hafter R, Coppenrath E, Pflanz MA, Schmitt M, Babic R, Linke R, Gössner W, Graeff H: Fibrin-fibronectin compounds in human ovarian tumor ascites and their possible relation to the tumor stroma. *Cancer Res.* Vol. 48, 3507–3514, 1988.

Wilhelm O, Hafter R, Henschen A, Schmitt M, Graeff H: Role of plasmin in the degradation of the stroma-derived fibrin in human ovarian carcinoma. *Blood* Vol. 75, 1673–1678, 1990. Graeff H, Jänicke F, Schmitt M: Klinische und prognostische Bedeutung tumorassoziierter Proteasen in der gynäkologischen Onkologie. *Geburth. u. Frauenheilk.* Vol. 51, 90–99, 1991.