

Aus dem Physiologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Ulrich Pohl

**Untersuchungen zur initialen Gerinnungsaktivierung durch
Blutzellinteraktionen und zirkulierende Mikropartikel**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von

Teresa Kauke
aus Plettenberg

2006

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. B. Engelmann

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. A. Faußner
Prof. Dr. med. St. K. Bohlander

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2006

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Zillmann A, Luther T, Mueller I, Kotsch M, Spannagl M, **Kauke T**, Oelschlägel U, Zahler S, Engelmann B. Platelet-associated tissue factor contributes to the collagen triggered activation of blood coagulation. Biochem Biophys Res Commun (2001), 281 (2): 603-609.

Kauke T, Mueller I, Kotsch M, Spannagl M, Luther T, Engelmann B. Activation of intravascular tissue factor: role of microparticles and neutrophil elastase. Joint Congress of the German and Scandinavian Physiological Societies. 12.-14. März 2001, Berlin.

Kongressbeiträge als Koautor:

Mueller I, Zillmann A, **Kauke T**, Spannagl M, Zahler S, Luther T, Engelmann B. Collagen rapidly activates tissue factor in platelet-leukocyte complexes. XV European Symposium on Blood Platelets. 19.-22. Oktober 2000, Bischoffsheim. Platelets (2001) 12, 39-57.

Mueller I, Luther T, Zillmann A, **Kauke T**, Kotsch M, Klocke A, Alex M, Zieseniss S, Engelmann B. Location and potential mechanism of activation of intravascular tissue factor. 16th International Congress of the International Society for Fibrinolysis and Proteolysis (ISFP), 2002, Sep. 8-13., München

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung	6
1.1 Das Hämostasesystem	6
1.1.1 Die Rolle der Thrombozyten.....	6
1.1.2 Die plasmatische Gerinnungsaktivierung	10
1.1.3 Die Bedeutung des TF	12
1.2 Antikoagulatorische Mechanismen.....	13
1.2.1 TFPI als Gegenspieler des Gerinnungsstarts.....	14
1.3 Fragestellung und Zielsetzung	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Auflistung der verwendeten Materialien	17
2.1.1 Verwendete Puffer	17
2.1.2 Materialien zur venösen Blutentnahme	18
2.1.3 Materialien zur Leukozytenpräparation	18
2.1.4 Materialien für die Faktor Xa-Bildung	18
2.1.5 Materialien für den Double-sandwich-ELISA.....	18
2.1.6 Verwendete Stimulantien und Inhibitoren.....	18
2.1.7 Verwendete Antikörper.....	19
2.1.8 Benutzte Geräte	19
2.1.8.1 Zentrifugen.....	19
2.1.8.2 Messinstrumente	19
2.1.8.3 Mikroskope	19
2.2 Methoden	20
2.2.1 Probandengruppe	20
2.2.2 Blutentnahme	20
2.2.3 Zellpräparationen	20
2.2.3.1 Neutrophile Granulozyten	20
2.2.3.2 Monozyten	21
2.2.3.3 Plättchen.....	22
2.2.3.4 Präparation von Thrombozytenüberstand.....	22

2.2.3.5	MP aus plättchenarmem Plasma	23
2.2.4	Faktor Xa-Bildung	23
2.2.5	Bestimmung der Fibrinbildung mittels Thrombelastographie	24
2.2.6	Herstellung einer inaktivierten Form des Faktors VIIa (VIIai)	26
2.2.7	Darstellung der MP in der konfokalen Laserscan-Mikroskopie	26
2.2.8	Messung des TF-Gehalts im Double-sandwich-ELISA	28
2.2.9	Proteinbestimmung der MP nach Bradford	29
2.2.10	Statistik	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Untersuchungen zur Optimierung der Gerinnungsstimulation.....	30
3.1.1	Bestimmung der Fibrinbildung nach Kollagenstimulation mittels TEG	30
3.1.1.1	Kollagenzeitreihe im isolierten Plättchen-Neutrophilengemisch.....	31
3.1.1.2	Kollagenzeitreihe im Plättchen-Monozytengemisch.....	32
3.1.1.3	Kollagenkonzentrationsreihe im Vollblut	33
3.1.2	Vollblutstimulation mit Kollagen und ADP	34
3.1.3	Vollblutstimulation mit Laminin und in Kombination mit Kollagen.....	35
3.2	Einfluss von rekombinantem TF auf die Gerinnungszeit	36
3.3	Anstieg der Xa-Bildung durch aktivierte Plättchen-Neutrophilengemische.....	37
3.3.1	Isolierte Plättchen im Vergleich zu Plättchen-Leukozytenkonjugaten	37
3.3.2	Hemmung der Gerinnungsaktivität durch inaktivierten Faktor VIIa (VIIai)...	38
3.4	Untersuchungen zur Beteiligung der Plättchen an der Fibrinbildung.....	40
3.4.1	Einfluss von ASS auf die Gerinnungszeit in vivo	40
3.4.2	Auswirkungen des Wirkstoffs Tirofiban auf die Faktor Xa-Bildung	42
3.4.3	Wirkung von Abciximab auf die prokoagulatorische Aktivität	43
3.5	Initiale Untersuchungen zum Aktivierungsmechanismus durch Blutzellinteraktionen	44
3.5.1	Proteaseninhibitoren hemmen die Faktor Xa-Bildung	44
3.5.2	Aktivierung der Plättchen durch HNE	45
3.5.3	Untersuchung zum Einfluß der MMP-9	46
3.5.4	Einfluß von Harnsäure und Katalase auf die Gerinnungsaktivität	47
3.5.5	Faktor X-Aktivität im PÜS.....	48
3.6	Untersuchungen zur Bedeutung des TFPI	49
3.6.1	Anstieg der Faktor Xa-Bildung durch anti-TFPI.....	49
3.6.2	Wirkung von anti-TFPI im Vollblutssystem.....	50

3.7	MP-assoziiertes TF	51
3.7.1	TF-Gehalt im Plasma und im MP-freien Plasma	51
3.7.2	Steigerung der Faktor Xa-Bildung durch MP	52
3.7.3	Effekt von anti-TFPI und MP	53
3.7.4	Die Wirkung von MP im Vollblut	54
3.8	Darstellung und Lokalisation der MP im Plättchen-Neutrophilengemisch	55
4	Diskussion	57
4.1	Gerinnungsaktivierung durch Kollagenstimulation	57
4.2	Auswirkungen einer Kollagenstimulation auf Plättchen und Neutrophile	58
4.2.1	Gerinnungsaktivierung durch Plättchen-Neutrophilen-Interaktionen	59
4.3	Mögliche Lokalisation und Quelle des TF	60
4.4	Aktivierungsmechanismen des MP-assoziierten TF	61
4.4.1	Mögliche Bedeutung von leukozytären Proteasen und Oxidantien	62
4.4.2	Aktivierung von TF durch Inaktivierung von TFPI	63
4.5	Die mögliche physiologische und pathologische Bedeutung des blutassoziierten-TF	64
4.6	Ausblick	66
5	Zusammenfassung	67
6	Literaturverzeichnis	69
7	Anhang	78
7.1	Danksagung	78
7.2	Lebenslauf	79

Abkürzungsverzeichnis

APC	Aktiviertes Protein C
α_1 -AT	α_1 -Antitrypsin
α_1 -ACT	α_1 -Antichymotrypsin
ADP	Adenosindiphosphat
ASS	Acetylsalicylsäure
BSA	Bovines Serum Albumin
CFT	Clot Formation Time
CMK	Chloromethylketon
CT	Clotting Time
CTI	Corn-Trypsin-Inhibitor
DIC	Disseminierte Intravasale Gerinnung
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPI	Extrinsic Pathway Inhibitor
EZ	Endothelzellen
GP	Glykoprotein
HNE	Humane Neutrophilen Elastase
kDa	Kilo Dalton
LACI	Lipoprotein Associated Coagulation Inhibitor
LPS	Lipopolysaccharide
LSM	Laserscan-Mikroskopie
MCF	Maximum Clot Firmness
Min.	Minuten
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MP	Mikropartikel
N	Neutrophile Granulozyten
P	Plättchen
PAP	Plättchenarmes Plasma
PAR	Protease Aktivierbarer Rezeptor
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphat Buffered Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PL	Phospholipide
PP	Plättchenpellet
PRP	Plättchenreiches Plasma
PÜS	Plättchenüberstand
Sek.	Sekunden

TEG	Thrombelastographie
TF	Tissue Factor (Gewebethromboplastin)
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
vs.	versus
vWF	von-Willebrand-Faktor

1 Einleitung

1.1 Das Hämostasesystem

Die Hämostase sorgt nach Gefäßverletzung für eine fortlaufende Zirkulation des Blutes im Gefäßsystem, ohne dass ein Sistieren des Blutflusses oder eine Blutung in das umliegende Gewebe die Folge wäre. Dafür ist ein perfekt abgestimmtes Zusammenspiel von Gefäßwand, Blutzellen und plasmatischen Gerinnungsfaktoren notwendig. Nach einem traumatischen Ereignis mit Eröffnung der Gefäßwand muss eine schnelle Blutstillung gewährleistet sein, um den Blutverlust gering zu halten. Gleichzeitig darf aber die Entwicklung des Blutpfropfes nur auf die Gefäßwandläsion begrenzt sein, um weitreichende Durchblutungsstörungen zu vermeiden. Nach dem Verlust der Gefäßwandintegrität kommt das Blut in Kontakt mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix wie z.B. Kollagen, Laminin oder Fibronectin, von denen es normalerweise durch das Endothel getrennt ist. Die Folge ist eine Aktivierung der Blutplättchen und der plasmatischen Gerinnungskaskade.

1.1.1 Die Rolle der Thrombozyten

Die Adhäsion der Blutplättchen an der Läsion ist der initiale Schritt der Blutstillung und wird vorwiegend von dem von-Willebrand-Faktor (vWF) vermittelt. vWF ist ein großmolekulares Glykoprotein mit einer multimeren Struktur, das in Endothelzellen und Megakaryozyten synthetisiert und in Weibel-Palade-Körperchen der Endothelien und den α -Granula der Plättchen gespeichert wird. Im Plasma bindet und transportiert vWF Faktor VIII und schützt den Blutgerinnungsfaktor so vor schnellem proteolytischem Abbau. In der primären Hämostase ist vWF ein wichtiges Adhäsionsprotein für Thrombozyten. Nach einer traumatischen Eröffnung der Gefäßwand wandelt sich vWF aus einer globulären in eine gestreckte Form um. Dadurch werden Bindungsstellen für Kollagen und Thrombozytenrezeptoren frei. Mit seiner A3-Domäne wird der Kontakt zum Endothel über Kollagen hergestellt. Für die Interaktion zwischen vWF und dem Plättchenrezeptor Glykoprotein (GP) Ib-V-IX ist die Präsentation der A1-Domäne des vWF notwendig [19]. Die Plättchen haften mit ihrem GPIb-Rezeptor an der A1-Domäne des vWF und sind über die A3-Domäne mit Kollagen an der Läsion verankert. Hohe Scherkräfte begünstigen die Bindung. Dieser

initiale Schritt ist entscheidend für eine funktionierende primäre Hämostase. Bei einem Defekt des thrombozytären GPIb-Rezeptors tritt eine Blutungsneigung auf, das Bernard-Soulier-Syndrom [20;56;76].

Weitere extrazelluläre Strukturproteine der verletzten Gefäßwand wie z.B. Kollagen, Fibronectin oder Laminin führen über die direkte Interaktion mit Thrombozyten zur Aktivierung der Plättchen und zur Konformationsänderung ihrer Rezeptoren (Abb.1). Dadurch verändern die Plättchen ihre Form (shape change) und Granulainhaltsstoffe werden freigesetzt (Degranulation). Als Folge kommt es zur Aggregation mit den bereits adhären Plättchen [106], die über Fibrinogen vermittelt wird, einem weiteren Plasmaprotein.

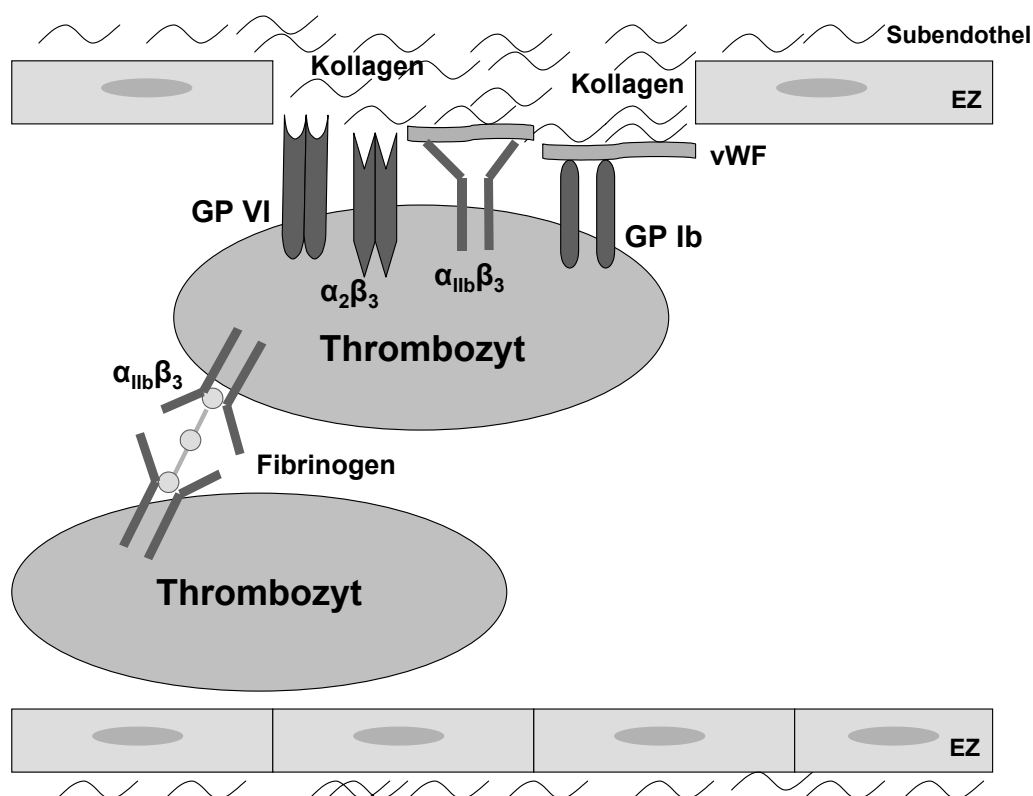


Abb.1: Nach einer Gefäßläsion aktivieren extrazelluläre Matrixproteine die Blutplättchen über verschiedene Rezeptoren. Die aktivierten Plättchen werden über das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ mit Fibrinogen vernetzt. EZ, Endothelzellen

Die zwei wesentlichen Kollagen bindenden Rezeptoren auf der Plättchenoberfläche sind das Integrin $\alpha_2\beta_3$ und GPVI [51;71;98]. Die Bindung von Kollagen an GPVI fördert die weitere Aktivierung von Plättchen und stabilisiert die Thrombusbildung. Durch Kato et al. wurde 2003 [51] gezeigt, dass bei GPVI knock-out Mäusen das Phänomen des Spreading nach Aktivierung nicht mehr auftrat und eine weniger stabile Adhäsion der Plättchen beobachtet wurde. Während der Adhäsion und der Formveränderung sezernieren die aktivierten Thrombozyten eine Reihe von gespeicherten Substanzen (Degranulation), die den Aktivierungsprozess verstärken. Blutplättchen besitzen eine Reihe von Speichersystemen: das offene kanalikuläre System (SCS), die dichten Granula (dense bodies), die α -Granula und die Lysosomen. Zu den sezernierten Substanzen gehören u.a. ATP, ADP, Ca^{2+} , vWF, Serotonin und PDGF. Patienten mit Defekten der Speichergranula (Storage Pool Disease) fallen mit einer hämorrhagischen Diathese auf, da die Stabilisierungsphase der Aggregation gestört ist [39].

Die Bindung der bereits aktivierten und adhären Plättchen mit den noch ruhenden, im Blut zirkulierenden Plättchen erfolgt über die Interaktion mit dem GPIIb-IIIa-Rezeptor (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$), der die Plättchen über Fibrinogenbrücken miteinander vernetzt. Der GPIIb-IIIa-Rezeptor muss zuvor aktiviert werden (Abb. 2), um die Bindungsstelle für Fibrinogen freizugeben [77]. Dieser Prozess ist Ca^{2+} -abhängig. Mutationen in diesem Komplex sind für den Morbus Glanzmann-Naegeli verantwortlich, bei dem die Patienten eine erhöhte Blutungsbereitschaft haben. Eine Inhibition des GPIIb-IIIa-Komplexes wird zur Behandlung von vaskulären Erkrankungen, wie z.B. arteriellen Verschlusskrankheiten und der koronaren Herzerkrankung eingesetzt [38;75].

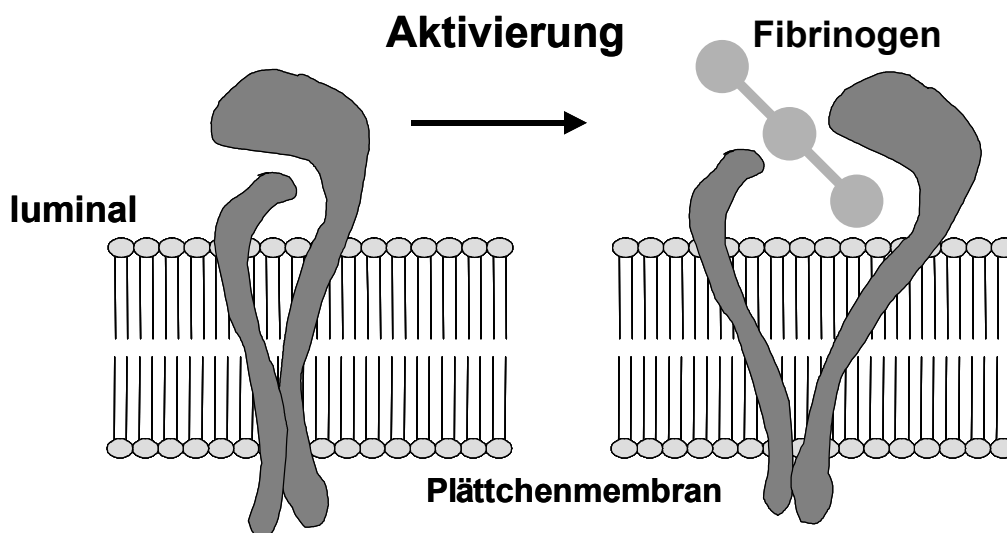


Abb.2: Der Plättchenrezeptor GPIIb-IIIa (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) gehört zu den Integrinen und besteht aus zwei Glykoproteinketten. Der Rezeptor bindet Fibrinogen zur Vernetzung von aktivierten Thrombozyten. Erst durch die Aktivierung des Rezeptors wird die Fibrinogenbindungsstelle freigegeben.

Die gemeinsame Endstrecke der Gerinnungskaskade und zugleich stärkster Thrombozytenaktivator ist das plasmatische Gerinnungsprotein Thrombin. Thrombin ist wie die anderen Gerinnungsfaktoren eine Serinprotease, die im Blut als inaktive Vorstufe (Prothrombin, Faktor II) vorliegt, und in aktivierter Form in der Lage ist, Fibrinogen in Fibrin umzuwandeln. Über die Fibrinbildung, aber auch durch direkte Aktivierung der Plättchen über den Protease aktivierbaren Rezeptor (PAR) 1 und PAR 4 verstärkt Thrombin den wachsenden Thrombus. Durch die Aktivierung der Plättchen kann es zur Exozytose von Membranvesikeln (Mikropartikeln) kommen, die prokoagulatorisch wirksam sind [8]. Die Mikropartikel (MP) weisen eine Exposition von Phosphatidylserin auf und könnten daher von besonderer Bedeutung für die Aktivierung der Blutgerinnung sein [18].

Seit Mitte der 70er Jahre wurde durch Russell Ross postuliert und ist seither allgemein anerkannt [94;95], dass die Arteriosklerose ein entzündliches Geschehen darstellt. An diesen Entzündungsreaktionen sind Leukozyten und auch Plättchen wesentlich beteiligt, indem sie eine Vielzahl an proinflammatorischen und proliferativen Substanzen sezernieren, die letztendlich zur Reparatur der Zellwandläsion beitragen können [25].

1.1.2 Die plasmatische Gerinnungsaktivierung

Das klassische Konzept der Blutgerinnung wurde von Paul Oskar Morawitz 1905 entwickelt. Danach wird die Gerinnung nur in Gang gesetzt, wenn Gewebethromboplastin, heute als Tissue Factor (TF) erkannt, ins Blut übertritt. An dem Prozess sind außerdem noch Calciumionen und die Plasmaproteine Fibrinogen (Faktor I) und Prothrombin (Faktor II) beteiligt. In Anwesenheit dieser Komponenten kann Prothrombin in Thrombin überführt werden und in kurzer Zeit große Mengen an Fibrinogen in Fibrin umwandeln. Dieser Weg wurde als extrinsischer Weg bezeichnet, weil ein extravaskulärer Faktor, der vor allem in der Gefäßwand und in Organkapseln lokalisiert ist [30], die Gerinnung startet. Zusätzlich besteht noch die Möglichkeit der Aktivierung über ein intrinsisches System, das Kontaktaktivierungssystem, das nach Kontakt mit anionischen Oberflächen durch die Aktivierung von Faktor XII ausgelöst wird.

Unser gegenwärtiges Bild des Gerinnungsvorgangs ist wesentlich differenzierter. So konnte gezeigt werden, dass der Faktor IX des intrinsischen Systems direkt durch den TF/Faktor VIIa-Komplex aktiviert werden kann [70;92]. Durch Gailani und Broze wurde 1993 [37] auch beobachtet, dass Thrombin Faktor XI direkt aktiviert und zwar ohne die vorherige Aktivierung von Faktor XII (Abb. 3).

TF gilt heute als der zentrale Initiator der physiologischen Blutgerinnung. Das intrinsische System ist nach heutigen Kenntnissen nicht mehr als physiologischer Hauptaktivator des Gerinnungsstarts anzusehen. Insbesondere nachdem in verschiedenen Studien [52] gezeigt wurde, dass es bei Faktor XII-Mangel zu keiner Blutungsneigung kommt. Vor einigen Jahren wurde sogar vermutet, dass Faktor XII defiziente Patienten eher gefährdet sind, venösen Thrombosen oder Myocardinfarkte zu erleiden. In weiteren Studien wurde dann aber beobachtet, dass in dem meisten untersuchten Thrombosefällen nicht ein solitärer Faktor XII-Mangel, sondern zusätzliche hereditäre oder erworbene Thromboserisikofaktoren ursächlich waren [42]. Neueste Studien [48;93] berichten über eine defekte und instabile Thrombusbildung bei Faktor XII-knock-out Mäusen und vermuten einen kooperativen und syngergistischen Effekt des TF/Faktor VIIa und Faktor XIIIa-Gerinnungswegs in vivo und eventuell auch bei der pathologischen Thrombusbildung. In dem vorgestellten Modell [93] ist die Faktor XII-Aktivierung auf der Oberfläche der Plättchen möglich und führt nach der initialen Phase zu einer Verstärkung der Fibrinbildung und Plättchenaktivierung.

TF ist in der Gefäßwand hauptsächlich in den adventitiellen Fibroblasten lokalisiert, aber auch in den glatten Gefäßmuskelzellen der Media. Nach einer Gefäßruptur kommt TF in Kontakt mit dem Blutgerinnungsfaktor VII. Faktor VII liegt als einziger Gerinnungsfaktor zu 1% bereits im Blut in aktiver Form (VIIa) vor. Alle anderen Gerinnungsfaktoren sind ausschließlich in inaktiven Vorstufen vorhanden. Der TF/Faktor VIIa-Komplex kann direkt über Faktor X als auch indirekt über Faktor IX die Gerinnung starten. Dadurch entstehen initial geringe Mengen Thrombin, die wiederum Plättchen, aber auch Gerinnungsfaktoren wie V, VIII und XI aktivieren und somit zu einer positiven Rückkopplung führen (Abb. 3). Der sogenannte Prothrombinasekomplex [49;70] besteht aus den Faktoren Xa, Va und Prothrombin und führt im Verlauf der Gerinnungskaskade zu einer 25-fachen Steigerung der Thrombinbildung. Damit werden die Voraussetzungen für einen stabilen Thrombus geschaffen. Über die Existenz von Verstärkungsmechanismen lässt sich erklären, warum zur Initiierung der Gerinnung nur geringe Mengen TF ausreichen, um eine effektive Blutstillung zu erzielen.

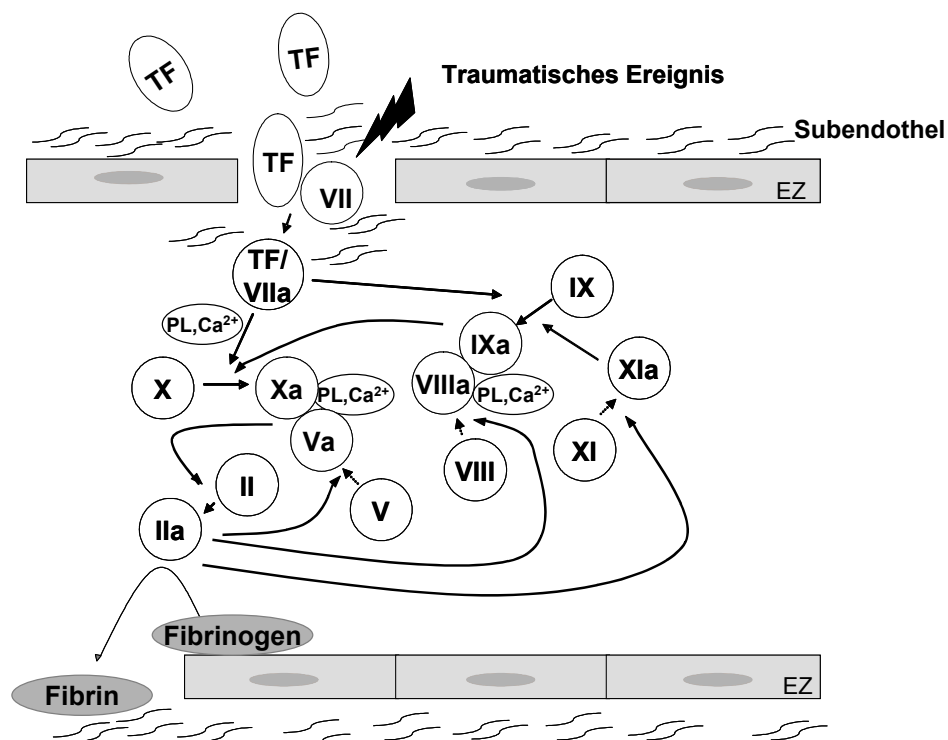


Abb.3: Gefäßwandläsion mit Exposition von extrazellulärer Matrix und TF im Blut. Die Abbildung zeigt die Aktivierungswege über den TF/Faktor VIIa-Komplex und die positiven Rückkopplungsmechanismen über die Thrombinbildung.

1.1.3 Die Bedeutung des TF

Die Identifizierung des Gens für das Strukturprotein TF fand erst vor ca. 20 Jahren [67] statt. Das TF Gen umfasst 12,4 kBp und ist auf dem langen Arm des Chromosom 1 (1p21-22) lokalisiert [50]. Es besteht aus 6 Exons, die durch 5 Introns getrennt werden [62].

Das reife „full length“ TF-Protein ist ein glycosyliertes 47 kD großes Zellmembranprotein. Aufgrund seiner Struktur wird es zu den Zytokinrezeptoren Klasse II gezählt [9]. TF ist ein Polypeptid, das in eine extrazelluläre, membrangängige und intrazelluläre Domäne eingeteilt ist [31]. Der extrazelluläre Teil ist mit 219 Aminosäuren die längste Domäne. Der transmembranäre und intrazelluläre Teil ist vergleichsmäßig kurz mit 23 und 21 Aminosäuren. Die extrazelluläre Domäne des TF besteht aus zwei Modulen mit β -Faltblattstruktur, die in einem Winkel von 120° zueinander stehen. Dazwischen ist die Bindungsstelle von Faktor VII/VIIa lokalisiert [7]. Die transmembranäre Domäne von TF erhöht durch die Verankerung in der Zellmembran und durch den Kontakt mit den Zelllipiden die Bindungsaffinität der Faktoren X und IX an den TF/Faktor VIIa-Komplex und ist für die funktionelle Aktivität des Komplexes von enormer Bedeutung. Der intrazelluläre Anteil verstärkt die proteolytische Aktivität des TF/Faktor VII-Komplexes durch eine intrazelluläre Signalantwort mit Kalziumeinstrom nach Bindung von Faktor VIIa an die extrazelluläre Domäne [15;90].

TF kommt hauptsächlich in gut durchbluteten Organen wie z.B. Gehirn, Niere, Plazenta und Lunge vor. Die nähere immunhistologische Untersuchung zeigte eine deutliche Anreicherung in Organkapseln [30], der Bowmankapsel und in der Adventitia von Gefäßwänden [104]. Zellen der Gefäßwand exprimieren konstitutiv TF. Innerhalb des Blutes besitzen Monozyten als einzige Blutzelle nachweisbare mRNA für TF und sind somit zur Synthese von TF fähig. Die Regulation der Expression liegt auf der Transkriptionsebene [31]. Die TF-Produktion von Monozyten ist induzierbar durch verschiedene Stimuli (Lipopolysaccharide, TNF α oder Interleukine). Nach einer Langzeitstimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) über mindestens 30 Min. steigt der TF Gehalt im Blut an [79;80]. Der Anstieg nimmt bei der Koinkubation mit Leukozyten und Thrombozyten nach LPS Stimulation deutlich zu, und lässt einen „encrypted TF“ vermuten [81;82], der erst durch einen noch ungeklärten Mechanismus aktiviert wird.

Die Bedeutung von TF ist nicht nur auf die physiologische Gerinnungsinitiierung beschränkt. Es wird auch eine Beteiligung des TF an der disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) diskutiert. Außerdem spielt TF eine zentrale Rolle für die arterielle Thrombose nach Ruptur arteriosklerotischer Plaques und die postoperativen Thrombosebildung [55]. Auch hat Carmeliet 1996 [16] einen Hinweis auf die Beteiligung von TF an der Angiogenese im Rahmen der Embryonalentwicklung geliefert.

1.2 Antikoagulatorische Mechanismen

Die Gerinnung besitzt durch Rückkopplungsmechanismen einen selbst verstärkenden Charakter. Ein dadurch verursachtes unkontrolliertes, überschießendes Thrombuswachstum würde zu einem Verschuß des Gefäßlumens führen. Deshalb werden gleichzeitig mit dem Start der Gerinnung antikoagulatorische Prozesse ausgelöst. Von besonderer Bedeutung ist die Möglichkeit einer direkten Neutralisierung von aktivierten Gerinnungsfaktoren, z.B. durch Antithrombin, Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) und das Thrombomodulin-Protein-C, Protein-S-System.

Antithrombin wirkt hauptsächlich als Inhibitor der Serinproteasen Thrombin und Faktor Xa. In geringem Maß werden auch die Faktoren IXa, XIa, XIIa und Plasmin gehemmt. Als Serinproteinaseninhibitor bindet Antithrombin an das aktive Zentrum der Proteasen und induziert dadurch eine irreversible Komplexbildung. Die Komplexbildung wird durch Heparin als Antikoagulanzen oder in vivo durch Heparansulfate beschleunigt. Ein weiteres wichtiges Inhibitorsystem ist das Protein-C, Protein-S-System. Protein C ist ein Vitamin K-abhängiges Protein, das erst nach Bindung an den Endothelzellrezeptor Thrombomodulin durch Thrombin in die aktivierte Form überführt wird. Das aktivierte Protein C (APC) ist in der Lage, die Faktoren Va und VIIIa proteolytisch zu inaktivieren, dabei fungiert Protein S als Cofaktor.

1.2.1 TFPI als Gegenspieler des Gerinnungsstarts

Der TFPI ist der physiologisch wichtigste Hemmstoff des TF/Faktor VIIa-Komplexes [11;91]. Seine Existenz und Bedeutung wurde schon in den 50er Jahren vermutet. Damals wurden Begriffe wie Lipoprotein Associated Coagulation Inhibitor (LACI) oder Extrinsic Pathway Inhibitor (EPI) gewählt, um die Funktion von TFPI zu beschreiben. 1988 konnte von Wun et al. [105] das TFPI-Protein isoliert und charakterisiert werden. Es besteht aus einer N-terminalen Region mit vielen sauren Aminosäuren, drei aufeinander folgenden Kunitz-Domänen und einer mit basischen Aminosäuren angereicherten C-terminalen Region.

Die Kunitz-2-Domäne ist für die calciumabhängige Bindung und Inhibierung des Faktor Xa im aktiven Zentrum verantwortlich. Initial reichen nur geringe Mengen Xa aus. Daraufhin bildet TFPI ebenfalls calciumabhängig über Bindung der Kunitz-1-Domäne an Faktor VIIa einen quaternären Komplex [12;41] (Abb. 4).

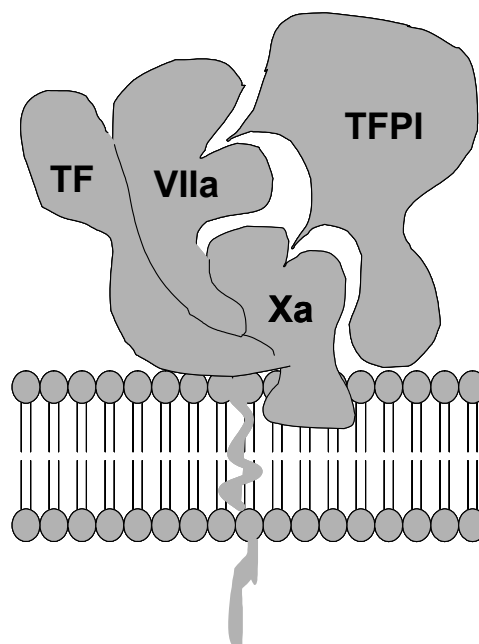


Abb.4: Quaternärer Komplex aus TF, Faktor VIIa, Faktor Xa und TFPI. Die Bindungsstelle mit dem aktivierten Faktor Xa wird über die Kunitz-2-Domäne vermittelt. Faktor VIIa bindet an die Kunitz-1-Domäne.

Durch die Bildung des quaternären Initialkomplexes ist die proteolytische Aktivität des TF/Faktor VIIa-Komplexes völlig neutralisiert. Für die Kunitz-3-Domäne ist bisher keine funktionelle Aktivität bekannt. Allerdings werden Interaktionen der Kunitz-3-Domäne mit Heparin und Lipoproteinen diskutiert [34]. Auf der anderen Seite wird dem C-Terminus des TFPI eine entscheidende Rolle in der antikoagulatorischen Aktivität zugesprochen [78;87].

TFPI wird hauptsächlich von Endothelzellen synthetisiert [5]. In immunhistochemischen Analysen fand man die höchsten TFPI Anteile in der Lunge und im Herzen [6]. Die TFPI Expression kann durch verschiedene Stimuli wie z.B. Scherkräfte [43] oder Thrombin [83] stimuliert werden. Eine signifikante Steigerung der TFPI Produktion von Endothelzellen wird auch nach der Gabe von Heparin beobachtet [58].

TFPI liegt in drei Kompartimenten im menschlichen Körper vor. Der Hauptanteil (80-85 %) befindet sich an der Oberfläche des Endothels gebunden an heparansulfatierte Proteoglykane. Teile des endothelialen TFPI sind in glykolipidreichen Mikrodomänen von Zellmembranen, den Caveolae, lokalisiert [21;57]. Caveolae sind vermutlich an Vorgängen wie Endozytose [99], Regulation der Signaltransduktion und der oberflächen-assoziierten Proteolyse [2] beteiligt. 10 % des TFPI liegen im Plasma vor, davon nur ein geringer Teil in freier Form; der Rest ist an Lipoproteine gebunden [96]. Den dritten Pool mit ca. 5-10 % stellt der mit Plättchen assoziierte TFPI dar [74]. Thrombozyten setzen den TFPI nach Stimulation mit Thrombin oder Kollagen frei [74]. Im Plasma befindet sich TFPI in unterschiedlich großen Spaltprodukten (34-45 kDa), die unterschiedliche inhibitorische Effekte besitzen [73]. Die maximale antikoagulatorische Wirkung hat nur TFPI mit kompletter Moleküllänge (45 kDa).

Es gibt bisher keine Daten über TFPI-defiziente Patienten, was auf die möglichen letalen Folgen eines Mangels an TFPI hinweist. Die klinische Relevanz des TFPI wird durch Studien deutlich, die zeigen, dass TFPI -knockout Mäuse (K1-/-) direkt nach der Geburt versterben [47]. Hierfür könnte die unkontrollierte Aktivität des TF/Faktor VIIa-Komplexes verantwortlich sein. TFPI wird gegenwärtig als Therapeutikum für verschiedene TF-assoziierte Krankheitsbilder diskutiert, wie z. B. für die disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) bei Sepsis und tiefen Beinvenenthrombosen [4].

Die proteolytische Spaltung von TFPI führt zu einer Verminderung seiner antikoagulatorischen Wirkung. Stimulierte Leukozyten sind in der Lage Proteasen auszuschütten, die TFPI inaktivieren können. Humane Neutrophilen Elastase (HNE) [44;89] oder Matrix-Metalloproteinasen (MMP) [22] spalten TFPI in vitro. Die Ergebnisse könnten auf eine Beteiligung der neutrophilen Granulozyten an der Regulation des TF-abhängigen Gerinnungsweges hindeuten.

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollten zur Klärung folgender Fragen beitragen:

- 1.) Wie beeinflusst die Kollagenstimulation die Interaktion zwischen Blutplättchen und neutrophilen Granulozyten? Durch welche Mechanismen wird die Gerinnung im Gemisch aus Plättchen und Neutrophilen aktiviert?
- 2.) Welche Rolle spielen dabei zirkulierende MP?
- 3.) Worin liegt die Bedeutung des TFPI bei der Aktivierung des intravasalen TF?

2 Material und Methoden

2.1 Auflistung der verwendeten Materialien

2.1.1 Verwendete Puffer

Resuspendierungspuffer:

138mM NaCl	Roth, Karlsruhe
2,7mM KCl	Roth, Karlsruhe
12mM NaHCO ₃	Roth, Karlsruhe
0,4mM NaH ₂ PO ₄	Roth, Karlsruhe
1mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Roth, Karlsruhe
5mM D-Glucose	Roth, Karlsruhe
5mM Hepes	Roth, Karlsruhe
in 500 ml Aqua dest. lösen, pH bei 7,35 einstellen	

Waschpuffer:

138mM NaCl	Roth, Karlsruhe
2,7mM KCl	Roth, Karlsruhe
12mM NaHCO ₃	Roth, Karlsruhe
0,4mM NaH ₂ PO ₄	Roth, Karlsruhe
1mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Roth, Karlsruhe
5mM D-Glucose	Roth, Karlsruhe
in 500 ml Aqua dest. lösen, pH bei 6,2 einstellen	

Antikörperpuffer für Mikrobeads:

5mM EDTA	Roth, Karlsruhe
0,5% BSA Fraktion V	Serva, Heidelberg
in 100ml PBS lösen, pH bei 7,4 einstellen und vor Gebrauch entgasen	

CaCl₂/Hepes-Puffer für TEG:

10mM Hepes	Roth, Karlsruhe
100mM CaCl ₂	Roth, Karlsruhe
in 10 ml Aqua dest. lösen, 60 µl der Lösung zu 300 µl Vollblut pipettieren, pH bei 7,4 einstellen	

Puffer für Double-sandwich ELISA:

0,05 M Tris/HCL	Roth, Karlsruhe
0,1 M NaCl	Roth, Karlsruhe
0,1 % Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
5 mM EDTA	Roth, Karlsruhe
in Aqua dest. lösen, pH bei 7,6 einstellen	

2.1.2 Materialien zur venösen Blutentnahme

Tri-Natriumcitrat 3,13%	Roth, Karlsruhe
Einmalspritzen 5, 10, 20 ml	Braun, Melsungen
Butterfly, 21 G x 3/4" , 0,8 x19mm	Braun, Melsungen

2.1.3 Materialien zur Leukozytenpräparation

Macs CD 14 und 15 Mikrobeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Macs Separation Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Trypan Blue Solution 0,4%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ficoll Paque Plus	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
PBS	PAN Biotech, Aidenbach
BSA	PAA Laboratories, Linz, Austria

2.1.4 Materialien für die Faktor Xa-Bildung

Beriplex PN 500	Behring, Marburg
Substrat 2222	Haemochrom Diagnostica, Essen
HAMS F10 (ohne Phenolrot)	PAN Biotech, Aidenbach
Thromboplastin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

2.1.5 Materialien für den Double-sandwich-ELISA

Substrat O-Phenylen-diamin	Fluka, Schweiz
----------------------------	----------------

2.1.6 Verwendete Stimulantien und Inhibitoren

Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Human Neutrophil Elastase (HNE)	Calbiochem, Schwalbach
Human Neutrophil Cathepsin G	Calbiochem, Schwalbach
Katalase	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
ADP	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Laminin	Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA
Thrombin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Collagenreagens Horm	Nycomed, Ismaning
OrthoRecombiPlasTin	Hemoliance, Raritan, NY
Reopro	Lilly Deutschland, Gießen
CMK	Bachem, Heidelberg
NovoSeven	Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dänemark
Acetylsalicylsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
ASS 500mg	Ratiopharm, Ulm
Iloprost	Schering, Berlin
Aggrastat	MSD, Haar
α_1 -Antitrypsin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
α_1 -Antichymotrypsin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Innovin	Dade Behring, Marburg
Corn-Trypsin-Inhibitor	Haemochrom Diagnostica (Essen)

2.1.7 Verwendete Antikörper

Mikrobeads anti-CD14 und CD15
 Maus-anti-Human TFPI (4904)
 Maus-anti-Human TF VIC7
 Maus-anti-Human TF VIC7 (Peroxidase+)
 Maus-anti-Human TF IIID8
 Maus-anti-Human TF VD8
 Anti-Matrixmetalloproteinase-9 (anti-MMP-9)

Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
 American Diagnostica, Pfungstadt
 PD Dr. T. Luther, Pathologie TU Dresden
 PD Dr. T. Luther, Pathologie TU Dresden
 PD Dr. T. Luther, Pathologie TU Dresden
 PD Dr. T. Luther, Pathologie TU Dresden
 Calbiochem, Schwalbach

2.1.8 Benutzte Geräte

Pipetman-Pipetten
 Pipetus Akku Pipettierhilfe
 MiniMacs Zellseparator
 Sonifier Cell Disruptor, Modell W185
 Vortex Genie 2

Abimed, Langenfeld
 Abimed, Langenfeld
 Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
 Heat Systems-Ultrasonic Inc., Plainview, NY
 Bender & Hobein, Zürich, Schweiz

2.1.8.1 Zentrifugen

Labofuge 400R
 Minifuge 2
 Biofuge 13
 Ultrazentrifuge Optima LE-80K

Heraeus Instruments, München
 Heraeus Instruments, München
 Heraeus Instruments, München
 Beckman, Krefeld

2.1.8.2 Messinstrumente

Coulter Counter
 Spektrophotometer, UV-1202
 ELISA Reader, Dynatech MR 7000
 Thrombelastograph RoTEG

Becton Dickinson, Heidelberg
 Shimadzu, Duisburg
 Dynatech Laboratories, Alexandria, USA
 Dynabyte, München

2.1.8.3 Mikroskope

Mikroskop Axiovert 100
 Laserscan LSM 410

Zeiss, Oberkochen
 Zeiss, Oberkochen

2.2 Methoden

2.2.1 Probandengruppe

Für die Experimente wurde venöses Vollblut von gesunden Probanden beider Geschlechter zwischen 20 und 35 Jahren gewonnen. Voraussetzung war, dass keine gerinnungsbeeinflussenden Medikamente innerhalb der letzten vierzehn Tage eingenommen worden waren.

2.2.2 Blutentnahme

Nach der Hautdesinfektion wurde die Vene mit einem Butterfly (21 Gauge) punktiert und das Blut in eine mit Na-Citrat gefüllte Kunststoffspritze aufgesogen. Die Endkonzentration des Na-Citrats in der Probe war 0,31%. Die ersten 5 ml Blut wurden verworfen, um eine mögliche Aktivierungsreaktion durch die Gefäßpunktion zu umgehen.

2.2.3 Zellpräparationen

Das so gewonnene Vollblut wurde auf je 10 ml Reagenzgläser aus Kunststoff verteilt und bei 170 x g für 15 Minuten (Min.) zentrifugiert. Dadurch wurde eine obere plättchenreiche Plasmaschicht, sowie ein Leukozytensaum, der sogenannte Buffy Coat, und ein Erythrozytensediment gewonnen.

2.2.3.1 Neutrophile Granulozyten

Die Isolierung von neutrophilen Granulozyten erfolgte über Zellseparations-Magnetsäulen (Mini Macs). Das Prinzip der Macs Separation besteht darin, magnetische Beads einzusetzen, die mit Antikörpern gegen Oberflächenantigene von Blutzellen, z.B. CD14 oder CD15, beschichtet sind. Die Beads binden über ihre Antikörper an die zu isolierenden Zellen. Während der Passage durch die Trennungssäulen im magnetischen Feld werden die Antigen-positiven Zellen über die daran gebundenen Beads zurückgehalten, wohingegen die unmarkierten Zellen

nicht binden und eluiert werden. Nach Entfernung der Säulen aus dem magnetischen Feld können die Antigen-positiven Zellen herausgelöst werden.

Nach Abnahme des Plasmaüberstandes, wurde der Buffy Coat vorsichtig mit einer Pipette aufgenommen und in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. Für die Neutrophilenpräparation wurde ein magnetisch-konjugierter Antikörper verwendet, der gegen CD15 gerichtet war. Die Anti-human-CD15 Microbeads (20 µl Antikörper pro ml Buffy Coat) wurden dazugegeben und für 15 Min. bei 10°C inkubiert. Währenddessen wurden die Säulen, die in Ethanol lagerten, mit Aqua dest. ausgespült und anschließend mit entgastem Antikörperpuffer durchspült. Die Zellsuspension mit den Antikörpern wurde schließlich in kleinen Portionen zu je 500 µl auf die Säulen verteilt. Um die Zellausbeute zu erhöhen, wurden Flußbegrenzer an die Enden der Säulen angebracht, um die Durchflusgeschwindigkeit zu verlangsamen. Nach Durchlaufen der Suspension wurden die Flußbegrenzer entfernt und viermal mit je 500 µl Antikörperpuffer nachgespült. Die Säulen wurden zuletzt aus dem Magnetfeld genommen, mit je 2 ml Puffer aufgefüllt und mit einem Stempel über einem Falconröhrchen ausgedrückt. Die Zelllösung wurde mit Resuspendierungspuffer aufgenommen und bei 170 x g für 10 Min. zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde das Neutrophilenpellet wieder in Resuspendierungspuffer gelöst. Durch Trypan-blue Zugabe wurde die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zellkammer, sowie auch die Morphologie und Reinheit der Zellen lichtmikroskopisch bestimmt.

2.2.3.2 Monozyten

Auch die Isolierung von Monozyten aus dem peripheren Blut erfolgte über die Bindung an magnetisch-gekoppelte Antikörper. Aufgrund des geringen Anteils der Monozyten an den Gesamtleukozyten war jedoch eine Vorbehandlung zur Separation der Monozyten nötig. Vor der Isolierung über die MiniMacs Säulchen wurde mittels eines Ficoll-Gradienten eine sogenannte Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC)-Suspension folgendermaßen gewonnen. Aus 50 ml Blut wurde ebenfalls ein Buffy coat hergestellt, der anschließend mit einer Plastikpipette in ein 50 ml Falcon überführt wurde. Die Leukozytensuspension wurde mit 10-15 ml PBS aufgefüllt. Um eine mononukleäre Zelllösung zu erhalten, schichtete man mit einer Pipettierhilfe die Lösung vorsichtig und langsam über 13 ml Ficoll Paque

(Dichte 1,077) und zentrifugierte bei 500 x g für 25 Min. ohne Bremse. Die durch die Zentrifugation gebildete Interphase, in der sich hauptsächlich PBMC befanden, wurde in einem Falcon gesammelt und mit 30 ml Monozyten-Waschpuffer aufgefüllt. Darauf folgte ein Waschschrift bei 200 x g für 10 Min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 30 ml Waschpuffer ein weiteres Mal gewaschen. Das so aufgereinigte Pellet wurde in 100-150 µl Antikörper-Puffer resuspendiert und mit 20 µl Anti-human-CD14-Microbeads versetzt. Die Inkubationszeit bei 10 °C betrug 15 Min. Danach wurde den Lösungen 1-2 ml Antikörper-Puffer beigefügt. Die weitere Behandlung über die MiniMacs-Zellseparationssäulen entsprach dem Procedere mit den neutrophilen Granulozyten.

2.2.3.3 Plättchen

Für die Isolierung von Blutplättchen wurde zunächst frisch entnommenes, antikoaguliertes Vollblut bei 170 x g für 15 Min. in der Labofuge 400R zentrifugiert. Die oberen 2/3 der Plasmaschicht, das sogenannte plättchenreiche Plasma (PRP), wurde abpipettiert und in 1 ml Portionen ein weiteres Mal bei 170 x g für 10 Min. zentrifugiert. Danach wurde das Plättchenpellet in je 300 µl Resuspendierungspuffer aufgenommen. Um eine Aktivierung der Plättchen während der Präparation zu verhindern, wurde das PRP vor dem Waschschrift mit 10 ng/ml Iloprost versetzt. Die Plättchen wurden mittels Coulter Counter gezählt und unter dem Lichtmikroskop auf Reinheit überprüft. Plättchenarmes Plasma (PAP) wurde hergestellt, indem PRP für 15 Min. bei 1000 x g zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde als PAP weiterverwertet.

2.2.3.4 Präparation von Thrombozytenüberstand

Isolierte Plättchen (2×10^7) wurden mit 12 µg/ml Kollagen für 5 min bei 37°C im Wasserbad stimuliert. Danach wurden die Plättchen bei 500 x g für 10 Min. zentrifugiert. Der Plättchenüberstand (PÜS) wurde abgenommen und das Plättchenpellet (PP) in Puffer resuspendiert.

2.2.3.5 MP aus plättchenarmem Plasma

Zur Isolierung zirkulierender MP wurden 100 ml Vollblut für 15 Min. bei 1500 x g zentrifugiert. Die oberen 2/3 des Plasmas wurden abpipettiert. Zur vollständigen Entfernung der Plättchen wurde das plättchenreiche Plasma nochmals bei 1500 x g für 15 Min. zentrifugiert. Das so gewonnene plättchenarme Plasma (PAP) konnte bis auf 1 cm Abstand zum Boden des Reagenzglas abgenommen werden und wurde auf Zentrifugenröhrchen für eine Ultrazentrifuge aufgeteilt. Das PAP wurde bei 160 000 x g für 240 Min. bei 4°C in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde aufbewahrt und das Pellet mit PBS vorsichtig resuspendiert und in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt. Danach folgte ein Waschschrift bei 100 000 x g für 60 Min. Das MP-Pellet wurde im Anschluss in Resuspendierungspuffer gelöst und der Proteingehalt nach Bradford bestimmt.

2.2.4 Faktor Xa-Bildung

Über die Bildung des aktivierten Faktors X (Faktor Xa) ist es möglich, die funktionelle Gerinnungsaktivität zu bestimmen. Der TF/Faktor VIIa Komplex kann Faktor X sowohl direkt als auch indirekt über Faktor IXa aktivieren. Um über den gebildeten Faktor Xa die prokoagulatorische Aktivität zu bestimmen, verwendeten wir einen chromogenen Assay, in dem Faktor Xa ein spezifisches Substrat spaltet. Als Substrat diente dabei S2222, dessen Produkt bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch bestimmt werden konnte. Zu jeder Messung wurde eine Standardreihe mit rekombinantem TF (0,05-0,1-0,2-0,4-0,8-1,6 mU/ml) durchgeführt.

Für einen Ansatz wählten wir ein Probenvolumen von je 50 µl. Die Probe beinhaltete die isolierten Blutzellen in Resuspendierungspuffer, die entweder einzeln oder in verschiedener Kombination stimuliert oder unstimuliert untersucht wurden. Die Zellen wurden in den folgenden Konzentrationen eingesetzt: 1×10^5 Monozyten, 1×10^6 neutrophile Granulozyten und $1,5 \times 10^7$ Plättchen. Die Blutzellen wurden in den meisten Fällen für 5 Min. bei 37°C im Wasserbad mit 12 µg/ml Kollagen stimuliert.

Die Proben und die Standardreihe wurden in eine 96-well Mikrotiterplatte vorgelegt. Dazu wurden je 50 µl einer CaCl₂-Lösung (4,5 mg/ml) und 100 µl eines chromogenen Mix zupipettiert. Der Mix bestand aus 3,375 ml HAMS, 225 µl Beriplex (25 IE/ml) und 400 µl S2222 (2 mg/ml). Beriplex enthält die humanen Gerinnungsfaktoren II, VII, IX

und X sowie die gerinnungshemmenden Faktoren Protein C und Antithrombin. Die Messung des chromogenen Produktes erfolgte in einem ELISA-Reader für 30 Min. bei Raumtemperatur. Die Absorption der Proben wurde mit Hilfe der Standardkurve in mU/ml umgerechnet.

2.2.5 Bestimmung der Fibrinbildung mittels Thrombelastographie

Die Thrombelastographie (TEG) stellt ein mechanisches Messprinzip der Fibrinbildung im Vollblut dar, das bereits vor mehr als 50 Jahren entwickelt wurde (Hartert, 1948). Die TEG-Analyse erfasst den gesamten Prozess der Vollblutgerinnung, von der Bildung der ersten Fibrinfäden über die maximale Ausprägung des Thrombus bis zu seiner Auflösung (Fibrinolyse).

In dem verwendeten RoTEG-System wurde die Probe in eine Kunststoff-Küvette pipettiert, die auf 37°C vorgeheizt war. Ein Stempel mit Kunststoffüberzug tauchte ein und drehte sich abwechselnd nach rechts und links. Mit einsetzender Gerinnung hemmte der Thrombus die Drehung des Stempels und zwar zunehmend mit ansteigender Gerinnselfestigkeit. Der Widerstand der Bewegung wurde über einen an das Messgerät angeschlossenen Computer digital aufgezeichnet (Abb.5).

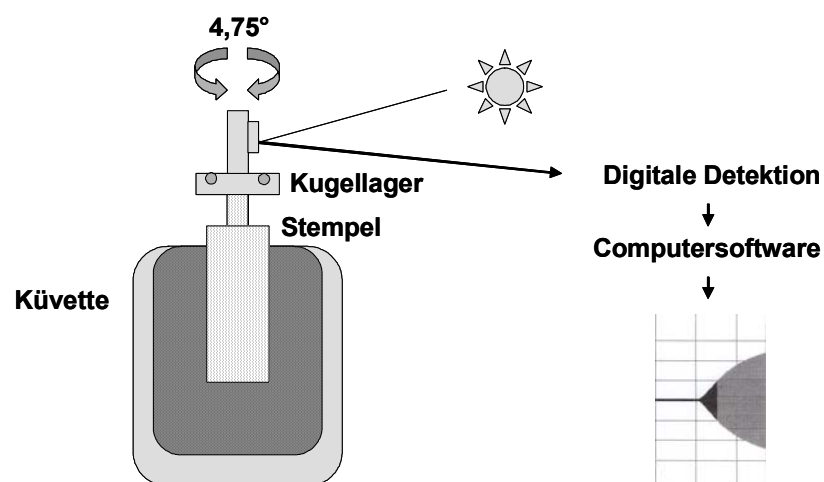


Abb. 5: schematische Darstellung des Messprinzips der TEG

CT (Clotting Time = Gerinnungszeit)	Zeit von Beginn der Messung bis die Gerinnung einsetzt	Gerinnungsaktivierung, Thrombinbildung, Beginn der Fibrinpolymerisation
CFT (Clot Formation Time = Gerinnselfestigungszeit)	Zeit ab dem Beginn der Gerinnung bis eine Gerinnselfestigkeit von 20 mm erreicht wird	Fibrinpolymerisation, Verfestigung des Gerinnsels durch Thrombozyten und FXIII
MCF (Maximum Clot Firmness = Gerinnselfestigkeit)	Maximale mechanische Ausprägung des Gerinnsels	Zunehmende Verfestigung durch das polymerisierte Fibrin, Thrombozyten und FXIII

Tab. 1: Parameter, die mit der TEG analysiert werden können.

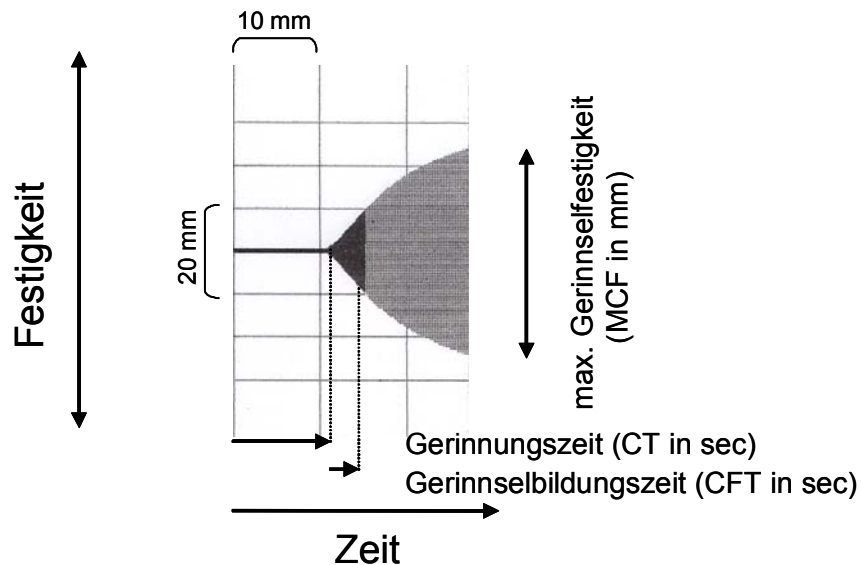


Abb. 6: Exemplarische Darstellung der aufgezeichneten Parameter

Für unsere Analysen verwendeten wir Citratblut. 300 µl Vollblut wurden in die vorgewärmte Küvette pipettiert und die Blutgerinnung mit 60 µl CaCl₂-Hepespuffer gestartet. In unseren Versuchen wurden unstimulierte und mit Kollagen (12 µg/ml) stimulierte Ansätze verglichen. Kollagen wurde direkt vor der Messung hinzupipettiert. Der Zusatz von Antikörpern, stimulierenden oder inhibierenden Substanzen erfolgte immer vor der Kollagenstimulation.

2.2.6 Herstellung einer inaktivierten Form des Faktors VIIa (VIIai)

Zur Überprüfung der Beteiligung des TF/Faktor VIIa-Komplexes verwendeten wir einen inaktivierten Faktor VIIa (VIIai). Hierzu wurde der aktivierte Faktor VII im aktiven Zentrum mit CMK (Phe-Phe-Arg-Chloromethylketon) derivatisiert. 2,4 mg Faktor VIIa (Novo Seven) wurden in 1,3 ml NaCl-Hepes-Puffer gelöst und mit der 10-fachen molaren Menge von CMK (0,268 mg) gemischt. Die Inkubation der Lösung wurde für 60 Min. bei Raumtemperatur durchgeführt. Im Anschluß daran erfolgte die Aufreinigung des inaktivierten Faktors VIIa durch mehrere Zentrifugationsschritte mittels Centricons mit einem Ausschlussgewicht von 10 kDa. Das freie CMK wurde bei 1050 x g aus der Lösung entfernt. Die Centricons wurden mit NaCl-Hepes-Puffer mehrfach gespült.

2.2.7 Darstellung der MP in der konfokalen Laserscan-Mikroskopie

Der Vorteil der Laserscan Mikroskopie (LSM) liegt darin, Fluorophore selektiv in einer einzigen Ebene der Probe zu erfassen. Die Lochblenden sorgen dafür, dass sämtliches Licht, das nicht aus dieser Ebene stammt, von dem Detektor nicht registriert wird (Abb. 7).

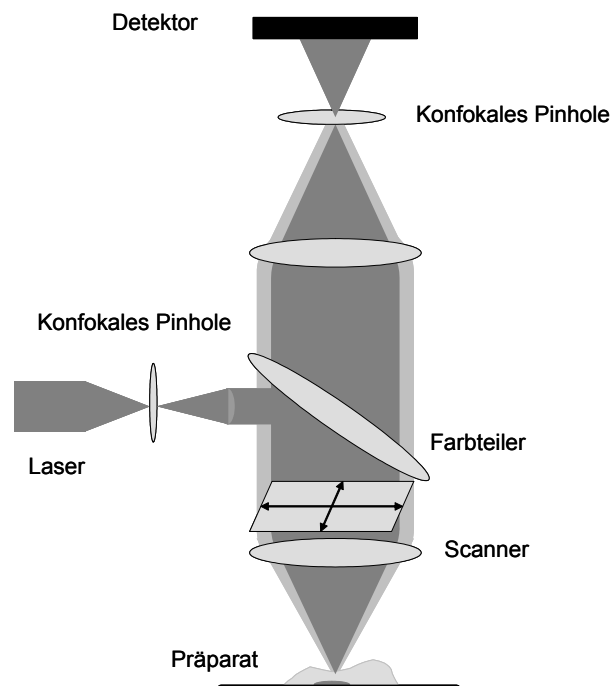


Abb. 7: Prinzip der konfokalen Laserscanmikroskopie

So ermöglichte uns die Laserscan Mikroskopie nicht nur die Darstellung der sehr kleinen MP (ca. 300 nm), sondern auch die Lokalisation der fluoreszierenden Partikel in Bezug auf die koinkubierten Zellen. In unserem Fall war hierbei die Fragestellung, ob die fluoreszenzmarkierten MP auf der Zellmembran der Neutrophilen oder Thrombozyten haften oder internalisiert wurden.

Die MP, die wir zuvor aus 100 ml Vollblut gesunder Spender präpariert hatten, wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Quinacrin, der eine Emissionswellenlänge von 510 nm besitzt, markiert. Zu 4 ml MP-Suspension wurden 100 μ l einer 4 mM Quinacrin-Lösung gegeben und bei Dunkelheit für 60 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben bei 160 000 x g für 60 Min. zentrifugiert und anschließend mit 10 ml PBS resuspendiert und erneut pelletiert. Diesen Vorgang wiederholten wir zweimal. Die gelabelten MP wurden anschließend in 200 μ l Resuspendierungspuffer aufgeschwemmt. Je 40 μ l der MP-Suspension wurden zu einer zuvor präparierten Zelllösung pipettiert, so dass der gesamte Ansatz ein Volumen von 200 μ l hatte.

Wir untersuchten in einem Ansatz zunächst die Fluoreszenz der markierten MP alleine. Dann wurden Suspensionen aus unmarkierten Neutrophilen (1×10^6) und aus unmarkierten Plättchen ($1,5 \times 10^7$) in je einem einzelnen Ansatz vergleichend mikroskopiert, um eine eventuelle Eigenfluoreszenz zu beurteilen. Schließlich wurden auch Suspensionen aus markierten MPn zusammen mit isolierten Neutrophilen und Thrombozyten fluoreszenzmikroskopisch beurteilt und dokumentiert. Für die Versuche wurden die verschiedenen Suspensionen für 15 Min. in Dunkelheit inkubiert. Ein Teil der Ansätze wurde zuvor mit Kollagen stimuliert. Nach der Inkubation erfolgte eine Zentrifugation bei 4500 x g für 5 Min.. Dieser Zentrifugationsschritt genügte, um die Zellen zu sedimentieren, ist aber nicht ausreichend, um die leichten MP zu pelletieren. Dazu wäre eine Zentrifugation für mind. 60 Min. bei 100 000 x g nötig. Somit konnten wir sicher sein, nur die MP, die auch an den Zellen gebunden waren, zu erfassen. Die ungebundenen MP wurden mit dem Überstand verworfen und das Pellet in 50 μ l PBS aufgenommen. Mit einer Cytospin-Zentrifuge (500 x g, 6 Min.) wurde die Probe anschließend auf einen Objektträger aufgebracht. Nach 30 Min., in der die Proben trocknen mussten, konnten die Beobachtungen beginnen.

2.2.8 Messung des TF-Gehalts im Double-sandwich-ELISA

Die Methode des Double-sandwich-ELISA benutzten wir, um den TF-Gehalt im humanen Plasma gesunder Spender zu bestimmen. Wir verglichen unbehandeltes PAP mit MP-freiem Plasma. Dazu entfernten wir, wie oben beschrieben, die MP aus dem PAP. Die Plasmen mit und ohne MP wurden mit einem 0,1% Tritonpuffer für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Für die Messung im ELISA wurde eine Mikrotiterplatte mit dem Anti-TF-Antikörper IID8 (10 µg/ml) beschichtet. Danach wurde die zu bestimmende Probe zugegeben und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer, um die Gefahr unspezifischer Reaktionen zu minimieren, konnte der zweite gegen TF gerichtete Antikörper zugesetzt werden. Der zweite Antikörper VIc7 war ein peroxidasegekoppelter Antikörper, zu dem nach 2 stündiger Inkubation mit der Probe das Substrats o-Phenylendiamin zugefügt wurde. Die Abbauprodukte des Substrates wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen. Die TF-Konzentration der Probe konnte mittels einer Standardreihe mit humanem TF Protein ermittelt werden.

Die Double-sandwich-ELISA Versuche sind in Kooperation mit dem Institut für Pathologie, Universität Dresden, bei Herrn Priv. Doz. Dr. Thomas Luther durchgeführt worden.

2.2.9 Proteinbestimmung der MP nach Bradford

Die Bestimmung des Proteingehalts der MP erfolgte nach der von Bradford beschriebenen Methode mit Hilfe eines Test-Systems der Firma Bio Rad. Bei jeder Versuchsreihe wurde eine Eichkurve mit γ -Globulin Standard in einer Konzentration von 120 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ Aqua bidest. ermittelt. Der Standard wurde für die Verdünnungsreihe 1:1 weiterverdünnt bis zu einer Konzentration von 7,5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$. Die zu bestimmende Proteinlösung wurde 1:5 und 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt. Zu je 100 μl Standard- oder Probenvolumen wurde das Bradford Farbreagenz in einer 1:5 Verdünnung zupipettiert. Die Inkubation mit der Testlösung erfolgte für 15 min. bei Raumtemperatur. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen und daraus mit Hilfe der Standardkurve die Proteinkonzentration der Probe bestimmt.

2.2.10 Statistik

Die statistische Signifikanz *p wurde mit der Software Jandel Scientific SigmaStat berechnet. Der Vergleich der Mittelwerte erfolgte mit Hilfe des ungepaarten t-Tests (bei Normalverteilung) oder des Mann-Whitney-Rank-Sum-Tests (bei Nicht-Normalverteilung). Für die Berechnung der Mittelwertunterschiede wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) verwendet. Die Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung ausgedrückt. Die *p-Werte <0,05 wurden als signifikant bezeichnet und sind in den Abbildungen mit * gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Optimierung der Gerinnungsstimulation

3.1.1 Bestimmung der Fibrinbildung nach Kollagenstimulation mittels TEG

Für unsere Gerinnungstests suchten wir nach einem physiologischen Stimulus, den wir in unseren Testsystemen stabil einsetzen konnten. In der Abb. 8 ist ein Thrombelastogramm dargestellt, das die Gerinnungszeit (CT=Clotting time) einer unstimulierten Vollblutprobe im Vergleich zu einer mit Kollagen (12 µg/ml; Typ I) stimulierten Probe zeigt. Die Stimulation mit Kollagen führte wie in Abb. 8 exemplarisch dargestellt zu einer verkürzten Gerinnungszeit (Fibrinbildungszeit). Um die Oberflächenaktivierung zu hemmen, wurde das Blut mit Corntrypsininhibitor (CTI, 50 µg/ml), einem spezifischen Inhibitor des Faktors XIIa, vorinkubiert. Auch nach Hemmung des Kontaktaktivierungssystems förderte Kollagen die Fibrinbildung in der TEG. In Tab. 2 sind die Mittelwerte (n=18) von Gerinnungszeit und Gerinnselbildungszeit von Kollagen-stimuliertem Vollblut mit und ohne CTI gegenüber unstimulierten Proben dargestellt. Im Mittel konnte durch Kollagen Stimulation eine Verkürzung der Fibrinbildungszeit um 40 % beobachtet werden.

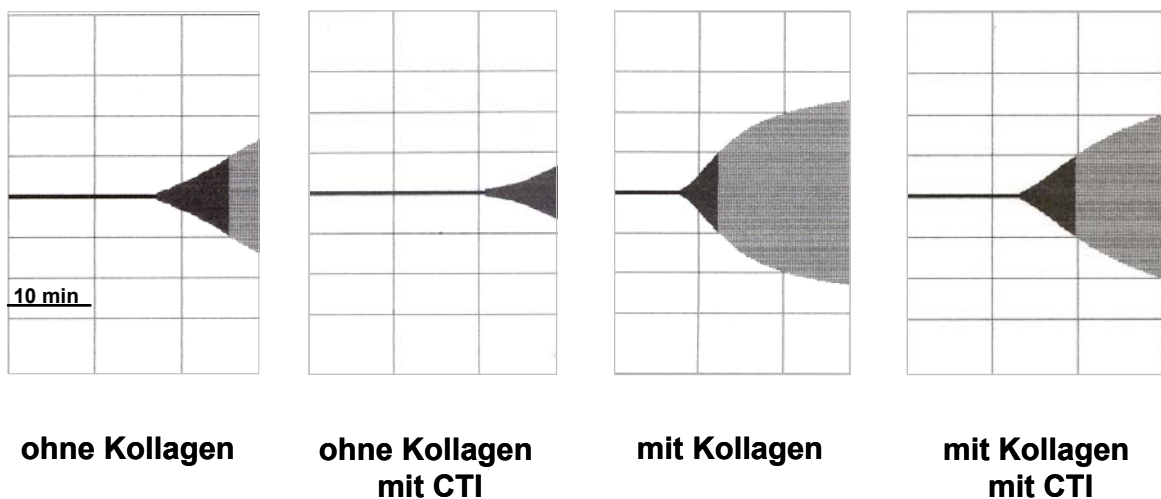


Abb. 8: Bestimmung von Gerinnungsparametern mittels TEG. Dargestellt ist eine unstimulierte und eine mit Kollagen (12 µg/ml) stimulierte Vollblutprobe jeweils ohne und mit Vorinkubation mit CTI (50 µg/ml). Die Kollagenstimulation beschleunigte die Gerinnung.

	ohne Kollagen	mit Kollagen	ohne Kollagen mit CTI	mit Kollagen mit CTI
CT (in sec)	883 +/- 128	508 +/- 48 *	1038 +/- 135	657 +/- 52 *
CFT (in sec)	505 +/- 106	323 +/- 64 *	646 +/- 112	418 +/- 64 *

Tab. 2: Gerinnungszeit (Clotting Time=CT) und Gerinnselbildungszeit (Clot Formation Time=CFT) von Vollblut im Mittel +/- Standardabweichung. n=18; p*<0,05 (vs unstimuliertes Vollblut)

3.1.1.1 Kollagenzeitreihe im isolierten Plättchen-Neutrophilengemisch

Im nächsten Schritt optimierten wir für unser System die Stimulationsdauer mit Kollagen. Als Testsystem verwendeten wir einen Faktor Xa-Bildungs-Assay. Wir wählten dafür ein Gemisch aus isolierten Plättchen und Neutrophilen aus, das bei 37°C mit Kollagen (12 µg/ml) inkubiert wurde. Bereits nach 1 Min. Kollagenstimulation zeigte sich ein Anstieg der Xa-Bildung. Nach 2 und 5 Min. stieg die Aktivität weiter an und erreichte ein Maximum (Abb. 9). Nach 10 Min. fiel die Aktivität wieder ab. Daher verwendeten wir für unsere weiteren Versuche eine Stimulationszeit von 5 Min.

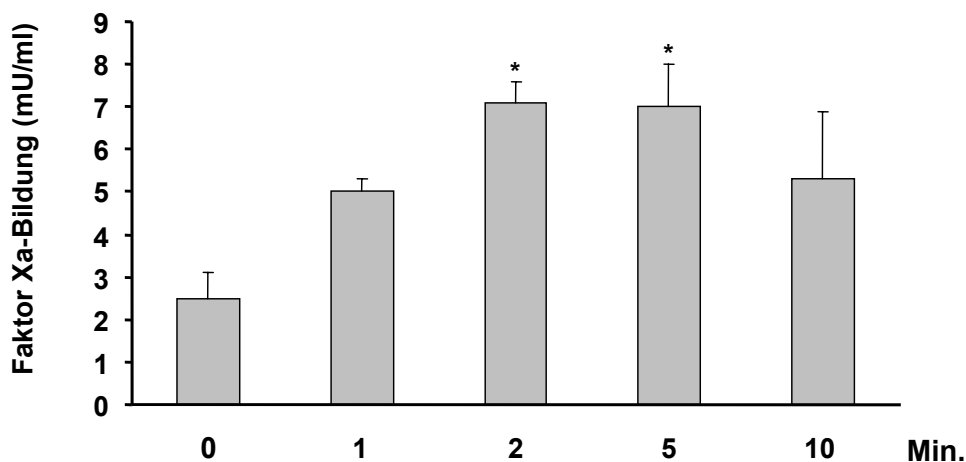


Abb. 9: Isolierte Plättchen plus Neutrophile wurden für verschiedene Zeitintervalle mit Kollagen (12 µg/ml) stimuliert. Die prokoagulatorische Aktivität des Plättchen-Neutrophilengemisches wurde durch die Faktor Xa-Bildung bestimmt. n=4; *p<0,05 (vs. 0 Min.)

3.1.1.2 Kollagenzeitreihe im Plättchen-Monozytengemisch

Zusätzlich verglichen wir die Kollagenwirkung auf ein Gemisch aus isolierten Plättchen und Monozyten. Die Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad mit Kollagen (12 µg/ml) inkubiert. Die Faktor Xa-Bildung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Die Suspensionen aus Plättchen und Monozyten zeigten insgesamt eine deutlich geringere Aktivität als die Plättchen-Neutrophilensuspensionen. Der zeitliche Verlauf der Kollagenstimulation war tendenziell vergleichbar. Auch im Plättchen-Monozytengemisch stieg die Aktivität nach 2 und 5 Min. an, um nach einer Stimulationsphase von 10 Min. wieder abzufallen (Abb. 10).

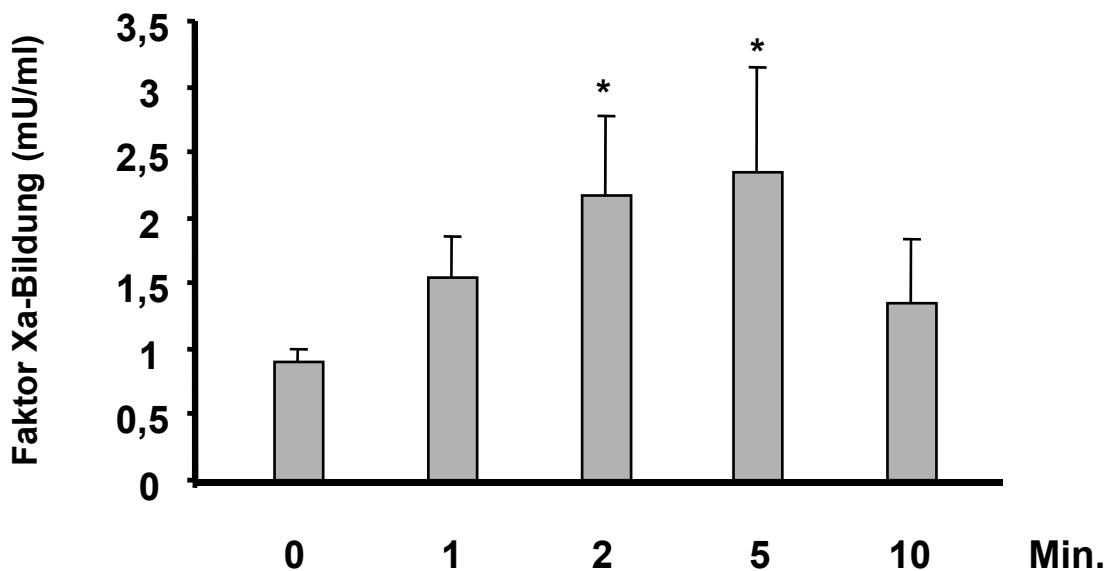


Abb. 10: Isolierte Plättchen plus Monozyten wurden für verschiedene Zeiten mit Kollagen (12 µg/ml) stimuliert. n=4; p*<0,05 (vs. 0 Min.)

3.1.1.3 Kollagenkonzentrationsreihe im Vollblut

Nachdem die Inkubationszeit auf 5 Min. festgelegt wurde, wurde die maximal wirksame Kollagenkonzentration ermittelt. Zu diesem Zweck untersuchten wir die Gerinnungszeit im Vollblut mittels TEG. In Abb. 11 sind die Ergebnisse unterschiedlicher Konzentrationen dargestellt. Die Kontrollprobe entspricht unstimuliertem Vollblut. Die Gerinnungszeit nahm mit höherer Konzentration von Kollagen zunächst stetig ab. Bei 15 µg/ml Kollagen wurde die kürzeste Gerinnungszeit erreicht. Interessanterweise war dies ein Konzentrationsoptimum, denn bei weiterer Erhöhung der Kollagenkonzentration auf 20 µg/ml Kollagen verlängerte sich die Gerinnungszeit wieder. Um in den folgenden Experimenten mit Sicherheit im gerinnungsaktivierenden Bereich zu liegen, entschieden wir uns, für eine Kollagenkonzentration von 12 µg/ml bei 5 Min. Inkubationszeit.

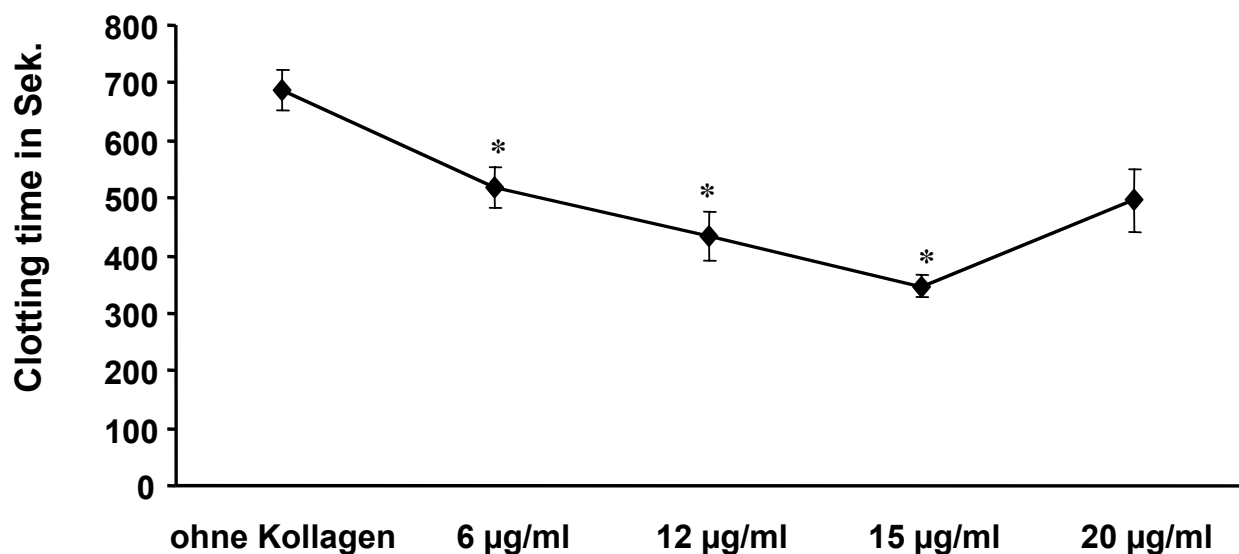


Abb. 11: Vollblut wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen Kollagen (Typ 1) stimuliert, um anschließend die Gerinnungszeit in der TEG zu messen. n=3; *p<0,05 (vs. unstimuliertes Vollblut)

3.1.2 Vollblutstimulation mit Kollagen und ADP

Danach wurde untersucht, ob die Kombination von Kollagen mit ADP möglicherweise einen stärkeren Stimulus als Kollagen alleine darstellen könnte. Dazu wurde Vollblut mit Kollagen (12 µg/ml) sowie zusätzlich mit 5 bzw. 10 µM ADP versetzt (Abb. 12). Auch die Gerinnungsaktivierung in Anwesenheit von ADP alleine wurde analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Gerinnungszeit mit 5 µM ADP alleine sowie in Kombination mit 12 µg/ml Kollagen gegenüber einer Stimulation mit 12 µg/ml Kollagen als alleiniger Stimulus nicht wesentlich verkürzte. Die höhere Konzentration an ADP (10 µM) reichte hingegen aus, um eine Gerinnungszeit zu erhalten, die vergleichbar zum Kollagen Stimulus (12 µg/ml) war. Wurde zu 10 µM ADP noch additiv Kollagen eingesetzt, war keine nennenswerte weitere Verkürzung der Gerinnungszeit festzustellen.

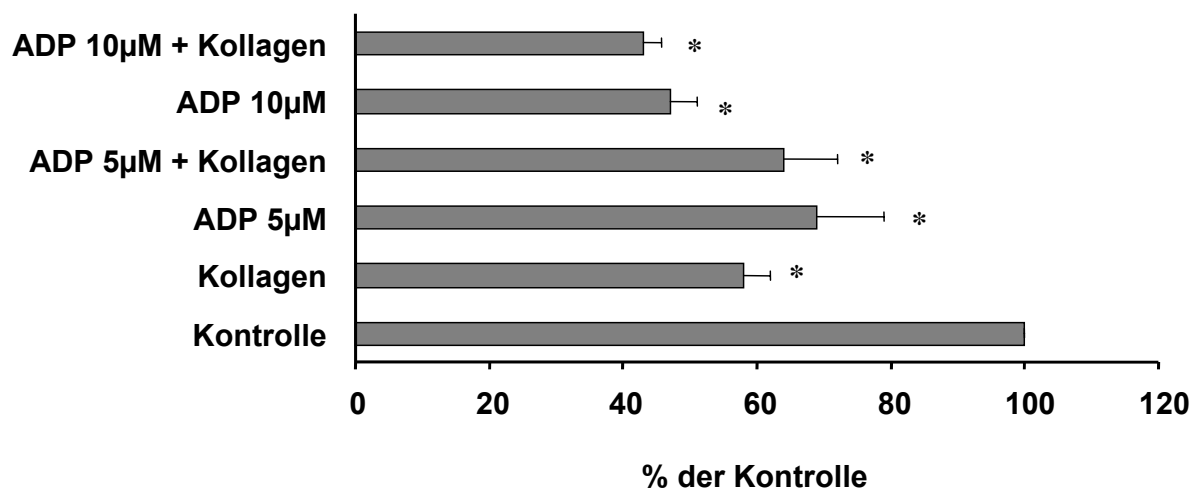


Abb. 12: Die Gerinnungszeit (CT in Sek.) wurde in der TEG bestimmt. n=6; *p<0,05 (vs. Kontrolle=unstimuliertes Vollblut)

3.1.3 Vollblutstimulation mit Laminin und in Kombination mit Kollagen

Laminin gehört zu den Hauptkomponenten nicht-kollagener Adhäsionsproteine, die in der extrazellulären Matrix vorkommen. Bei einer Gefäßwandverletzung kommt auch Laminin mit dem Blut in Kontakt. Uns interessierte, ob möglicherweise Laminin eine bisher nicht beachtete Aufgabe bei der Gerinnungsaktivierung haben könnte.

Wir testeten deshalb Laminin in verschiedenen Konzentrationen als Vollblutstimulans. Laminin in einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ verkürzte die Gerinnungszeit. Parallel untersuchten wir auch Laminin in Kombination mit Kollagen. Durch die gleichzeitige Anwesenheit von Kollagen wurde die Fibrinbildungszeit weiter beschleunigt (Abb. 13).

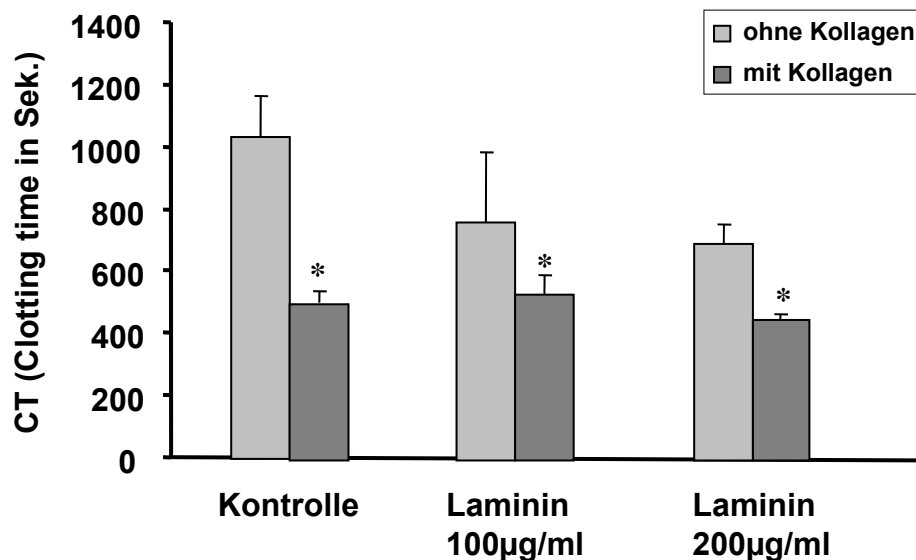


Abb. 13: Die Gerinnungszeit (CT) von Kollagen (12 $\mu\text{g/ml}$) stimuliertem Vollblut wurde in der TEG gemessen. Die Zeiten wurden verglichen mit Vollblut, das alleine mit Laminin in den angegebenen Konzentrationen sowie zusätzlich mit Kollagen aktiviert wurde. $n=4$; $p^*<0,05$ (vs. Kontrolle=unstimuliertes Vollblut)

3.2 Einfluss von rekombinantem TF auf die Gerinnungszeit

Um das Ausmaß der Gerinnungsaktivierung durch Kollagenstimulation im Vollblut mit der Stimulierung durch TF zu vergleichen, verwendeten wir rekombinanten TF. Es wurden Innovin und ORTHO RecombiPlasTin (RPT) Konzentration von jeweils 0,1 ng/ml eingesetzt. In der Abb. 14 sind die CT- (Clotting time in Sek.) und die CFT- (Clotting formation time in Sek.) Werte aufgetragen. Man sieht eine deutliche Beschleunigung zur unstimulierten Kontrolle. Beide rekombinanten Produkte zeigen einen ähnlichen Effekt. Kollagenstimulierung wirkt etwas weniger stimulierend als rekombinanter TF in der eingesetzten Konzentration.

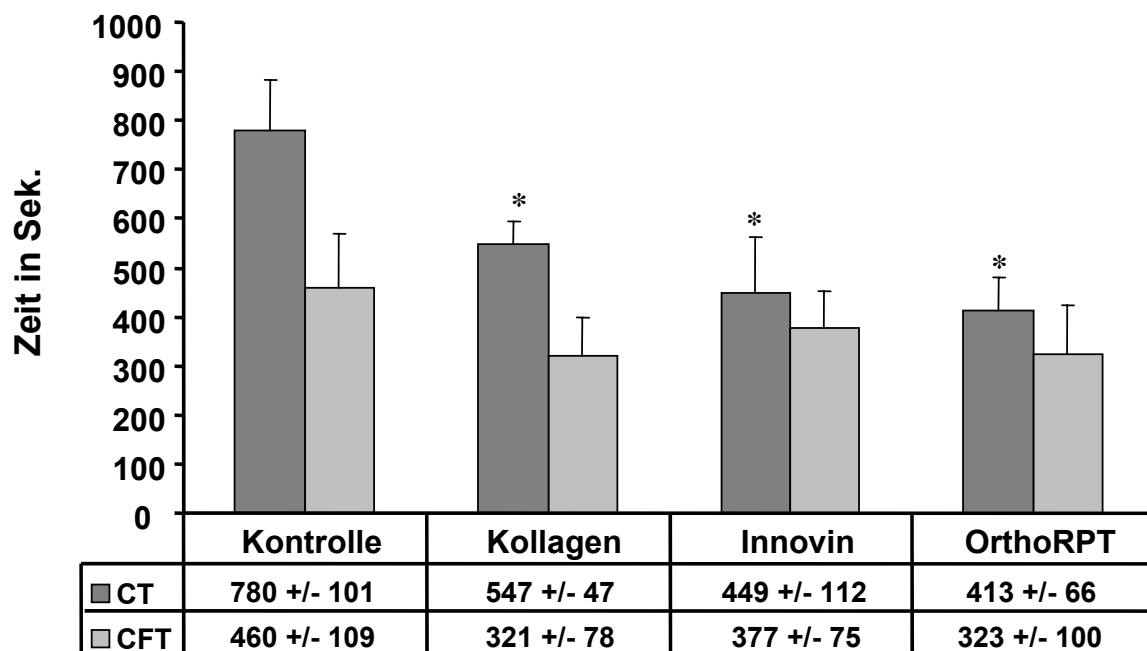


Abb. 14: Stimulation von Vollblut mit rekombinantem TF. Innovin (0,1 ng/ml) und ORTHO RPT (0,1 ng/ml) wurden getestet. Im Vergleich die unstimulierten und mit Kollagen aktivierten Proben. n=6; p* $<$ 0,05 (im Vergleich zur Kontrolle)

3.3 Anstieg der Xa-Bildung durch aktivierte Plättchen-Neutrophilengemische

3.3.1 Isolierte Plättchen im Vergleich zu Plättchen-Leukozytenkonjugaten

Nach den Vollblutuntersuchungen überprüften wir die Wirkung von ADP (10 μ M) und Kollagen auf die Faktor Xa-Bildung in Gegenwart von isolierten Blutzellen (Abb. 15). Dabei ergab sich, dass beide Stimulantien auch hier einen ähnlichen Effekt auf die Gerinnungsaktivierung hatten. Insbesondere war die Faktor Xa-Bildung isolierter Plättchen alleine gegenüber einem Gemisch aus isolierten Plättchen und Neutrophilen gemeinsam deutlich vermindert.

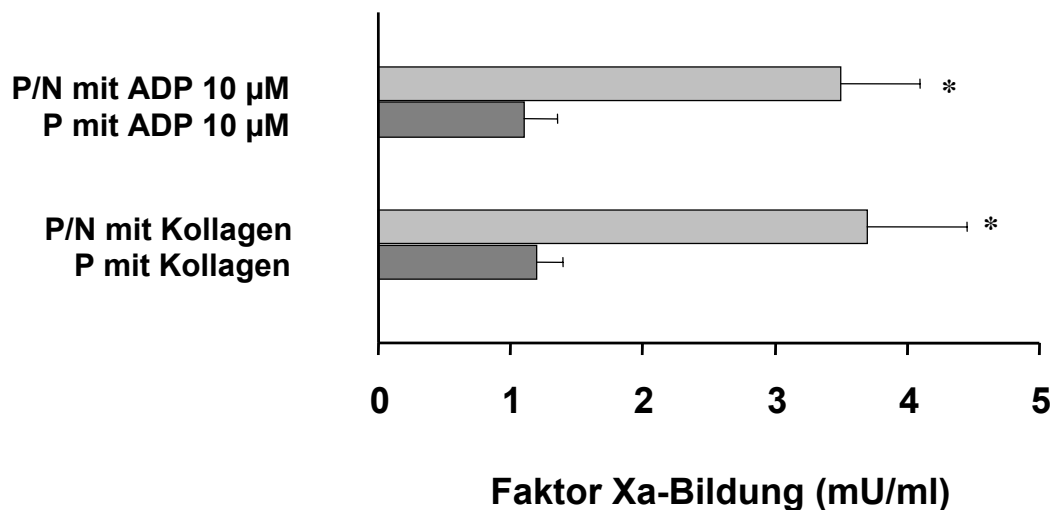


Abb. 15: Isolierte Plättchen (P) wurden mit ADP (10 μ M) bzw. mit Kollagen aktiviert. Ebenso wurden isolierte Plättchen zusammen mit Neutrophilen (N) mit jeweils beiden Stimulantien versetzt. n=4; $p^* < 0,05$ (vs. isolierte stimulierte Plättchen)

3.3.2 Hemmung der Gerinnungsaktivität durch inaktivierten Faktor VIIa (VIIai)

In unseren Versuchen fiel auf, dass sowohl aktivierte Plättchen als auch Neutrophile alleine die Bildung von Faktor Xa gering stimulierten. In den Plättchen-Leukozyten-Konjugaten allerdings zeigten Stimulantien wie ADP und Kollagen eine signifikante Steigerung der Faktor Xa-Bildung. Der im aktiven Zentrum durch Chloromethylketon inaktivierte Faktor VIIa (VIIai) konnte die Faktor Xa-Bildung zu 60 % hemmen (Abb. 16). Das sahen wir als Hinweis auf die Beteiligung des TF/Faktor VIIa-Komplexes für die Stimulierung der Blutgerinnung in Plättchen-Leukozyten-Suspensionen.

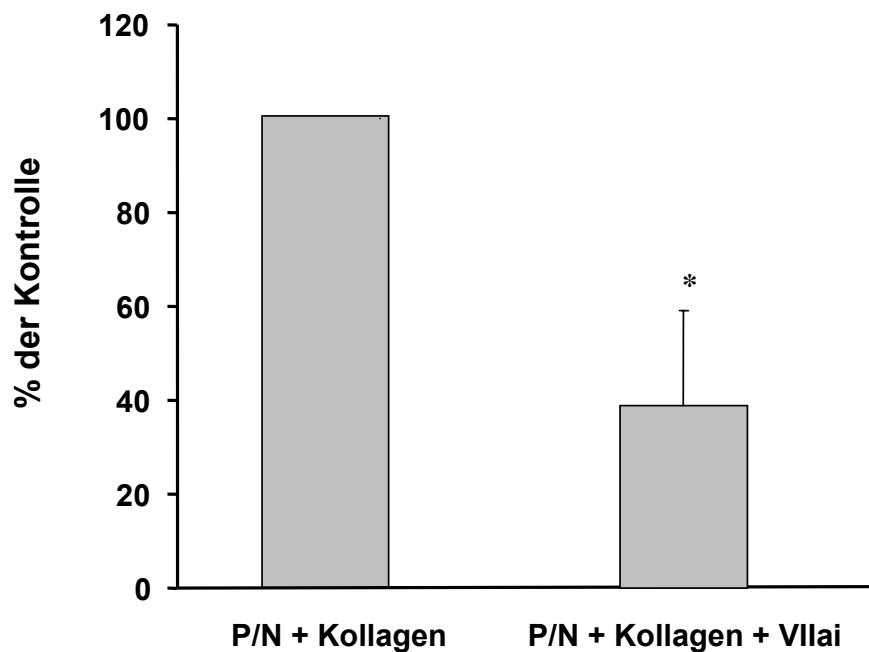


Abb. 16: Kollagen stimulierte Suspensionen aus Plättchen und Neutrophilen (P/N) wurde mit dem im aktiven Zentrum durch Chloromethylketon inaktivierten Faktor VIIa (VIIai, 10 nM) versetzt. n=5; $p^* < 0,05$ (vs P/N +Kollagen)

Um die funktionelle Aktivität des TF/Faktor VIIa-Komplexes im Vollblut zu untersuchen, wurde die Auswirkung von Kollagen auf die Fibrinbildung mit Hilfe der TEG bestimmt. Wir beobachteten eine Hemmung der Fibrinbildungsrate und des Thrombuswachstums im kollagenstimulierten Vollblut nach Inkubation mit Faktor VIIai (500nM).

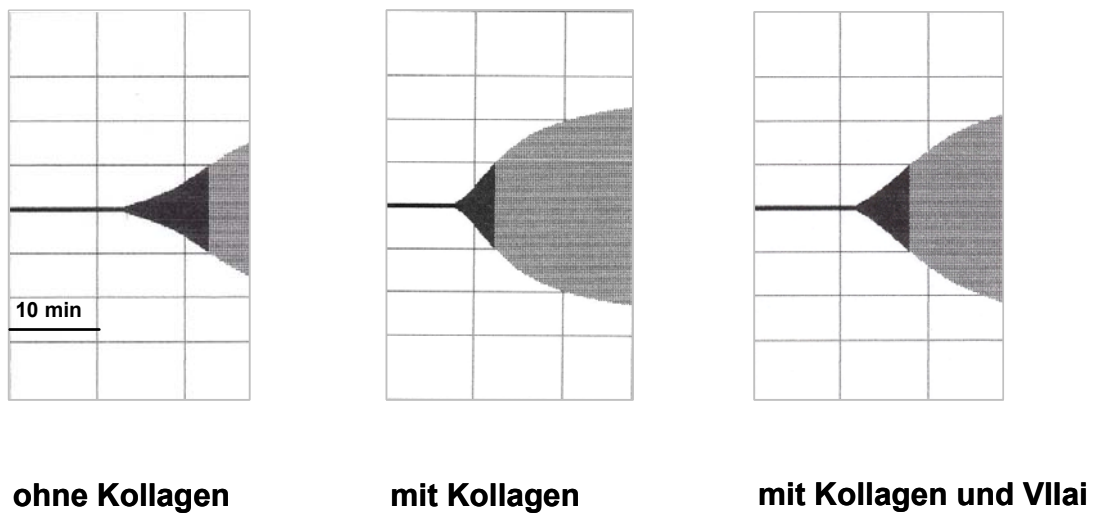


Abb. 17: Hemmung der Fibrinbildung in der TEG im stimulierten Vollblut durch inaktivierten Faktor VIIa (500 nM).

3.4 Untersuchungen zur Beteiligung der Plättchen an der Fibrinbildung

3.4.1 Einfluss von ASS auf die Gerinnungszeit in vivo

Um die Wirkung von Acetylsalicylsäure (ASS) auf die Gerinnungszeit in vivo zu testen, wurde einer Probandengruppe von 6 Personen zwischen 25 und 40 Jahren, die zum Zeitpunkt der Untersuchung keine antikoagulatorischen Medikamente einnahmen, an drei verschiedenen Zeitpunkten Blut abgenommen und das Blut unstimuliert und mit Kollagen stimuliert in der TEG gemessen. Unmittelbar vor der Einnahme wurde die erste Messung als Kontrolle durchgeführt. Der zweite Zeitpunkt war 24 h nach der p.o. Einnahme von 500 mg ASS festgesetzt und die abschließende Messung erfolgte 10 Tage später. Abb. 18a stellt exemplarisch einen Probanden vor. Man sieht eine geringe Verlängerung der Fibrinbildungszeit 24 h nach ASS-Einnahme. Die Gerinnselfestigkeit und –festigkeit ist geringer als in der Kontrollmessung. Nach 10 Tagen erkennt man nur noch eine leichte Beeinflussung der Gerinnungszeit.

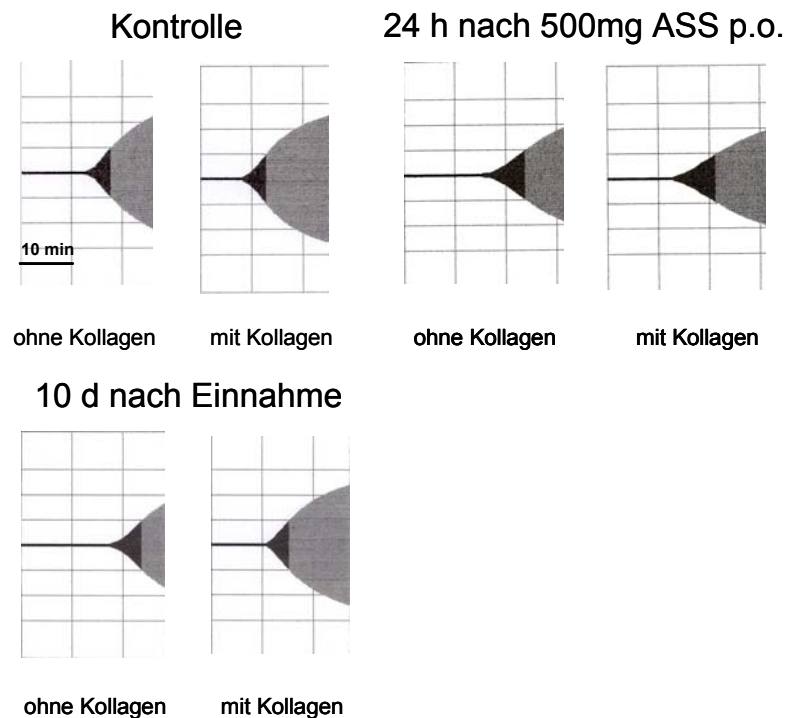


Abb. 18a: Vollblutgerinnung einer unstimulierten Probe sowie einer mit Kollagen (12 µg/ml) stimulierten Probe. Zur Kontrolle dient die Probe unmittelbar vor Einnahme des Medikaments. Die Gerinnungszeit wurde 24 h und 10 d nach Einnahme von ASS gemessen.

In Abb. 18b sind die Mittelwerte der Gerinnungszeiten der einzelnen Probanden +/- Standardabweichung aufgetragen. Die unstimulierte und die stimulierte Probe verhalten sich in den verschiedenen Zeitpunkten ähnlich. Es lässt sich im Unterschied zur Kontrolle eine Tendenz zur Verlängerung der Fibrinbildungszeit durch ASS-Gabe bei der mit Kollagen stimulierten Probe 24 h nach der Medikamenteneinnahme feststellen.

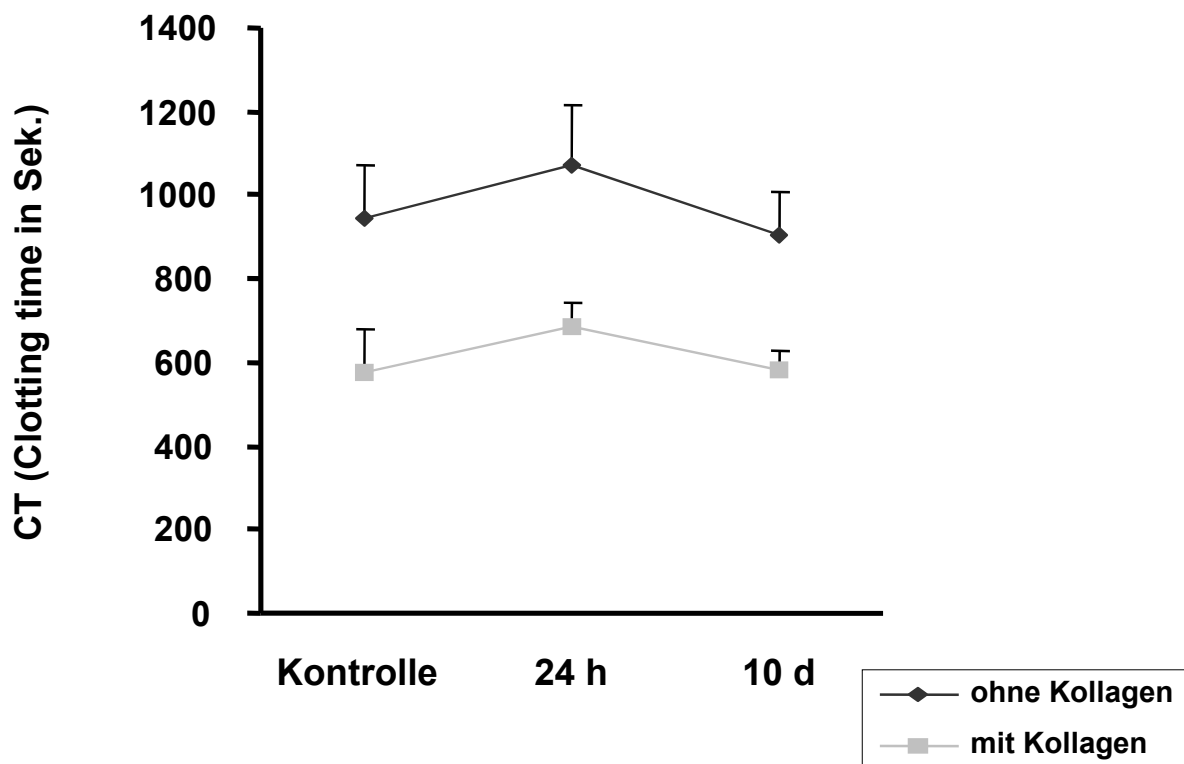


Abb.18b: Die Wirkung von ASS auf die Gerinnungszeit wurde an gesunden Probanden untersucht. Die Gerinnungszeit des Vollbluts wurde vor der Einnahme (Kontrolle), 24 Stunden und 10 Tage nach einmaliger Gabe von 500 mg ASS p.o. mit und ohne Kollagenstimulation bestimmt. n=6

3.4.2 Auswirkungen des Wirkstoffs Tirofiban auf die Faktor Xa-Bildung

Tirofiban ist ein Nonpeptid-Inhibitor des thrombozytären GPIIb-IIIa-Rezeptors, der zur Familie der Integrine gehört und durch Bindung von Fibrinogen und vWF mitverantwortlich für die Plättchenaggregation ist. Wir testeten die Wirkung von Tirofiban auf die prokoagulatorische Aktivität isolierter Plättchen und Neutrophiler, die vor der Kollagenstimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen des Wirkstoffs inkubiert wurden. Tirofiban führte schon in einer geringen Dosis von 0,5 ng/ml zu einer signifikanten Inhibierung der Faktor Xa-Bildung. Anhand der Ergebnisse sahen wir einen konzentrationsabhängigen Verlauf der Hemmung (Abb. 19). Ab einer Konzentration von 5 ng/ml wurde ein Sättigungseffekt erzielt.

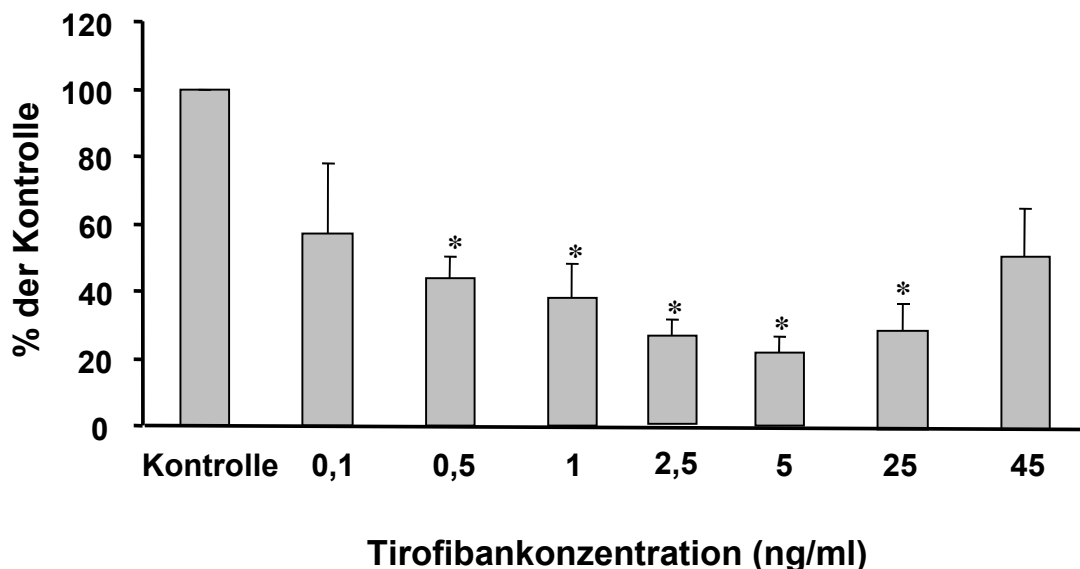


Abb. 19: Einfluß des thrombozytenaggregationshemmenden Wirkstoffs Tirofiban auf die Bildung von Faktor Xa. Isolierte Thrombozyten plus neutrophile Granulozyten wurden mit verschiedenen Konzentrationen des GPIIb-IIIa-Antagonisten für 5 Min. bei 37°C inkubiert und danach mit Kollagen stimuliert. Kollagenstimulierte Zellen ohne Tirofibanzusatz wurden als Kontrolle verwendet und entsprechen 100%. n=4; p*<0,05

3.4.3 Wirkung von Abciximab auf die prokoagulatorische Aktivität

Abciximab ist ein Fab Fragment, das spezifisch an den thrombozytären GPIIb-IIIa-Rezeptor bindet. Wir inkubierten die isolierten Zellen 5 Min. vor der Kollagenstimulation mit steigenden Abciximab-Konzentrationen. Nach der anschließenden Stimulation mit Kollagen wurde die Entstehung von Faktor Xa gemessen. Überraschenderweise konnten wir bei keiner Konzentration des Antikörpers eine Hemmung der Aktivität beobachten.

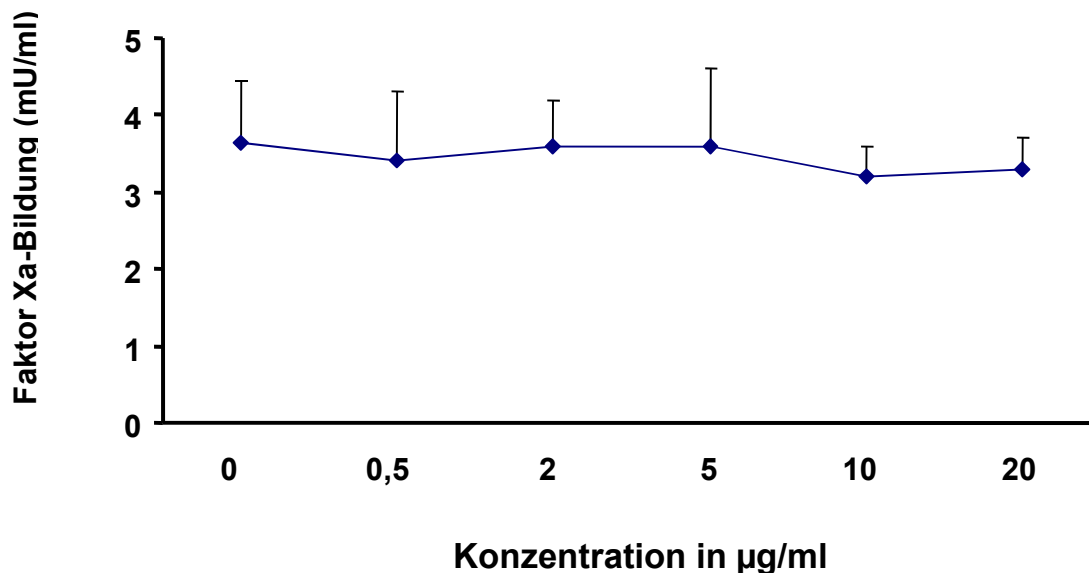


Abb. 20: Zu isolierten Plättchen und Neutrophilen wurde 5 Min. vor der Stimulation mit Kollagen der Wirkstoff Abciximab in verschiedenen Konzentrationen zugemischt und die Faktor Xa-Bildung gemessen. $n=4$; vs. Kontrolle=Isolierte Plättchen plus Neutrophile ohne Abciximab

3.5 Initiale Untersuchungen zum Aktivierungsmechanismus durch Blutzellinteraktionen

3.5.1 Proteaseninhibitoren hemmen die Faktor Xa-Bildung

Die deutliche Steigerung der Faktor Xa-Bildung von aktivierten Plättchen durch Neutrophile wies auf die entscheidende Bedeutung der Interaktion der Blutzellen auf die prokoagulatorische Aktivität hin. Um die Rolle der Neutrophilen für die Faktor X-Aktivität zu überprüfen, testeten wir die Beteiligung von leukozytären Proteasen. Es wurden drei spezifische Inhibitoren gegen Serinproteasen eingesetzt, die 5 Min. vor der Kollagenstimulation zu den isolierten Plättchen und Neutrophilen gegeben wurden. In Anwesenheit von α_1 -Antitrypsin und CMK, zwei spezifischen Inhibitoren der neutrophilen Elastase, konnte die Faktor Xa-Bildung um mehr als 50 % gehemmt werden. Der Cathepsin G –Inhibitor zeigte eine 28 %-ige Hemmung der Entstehung von Faktor Xa.

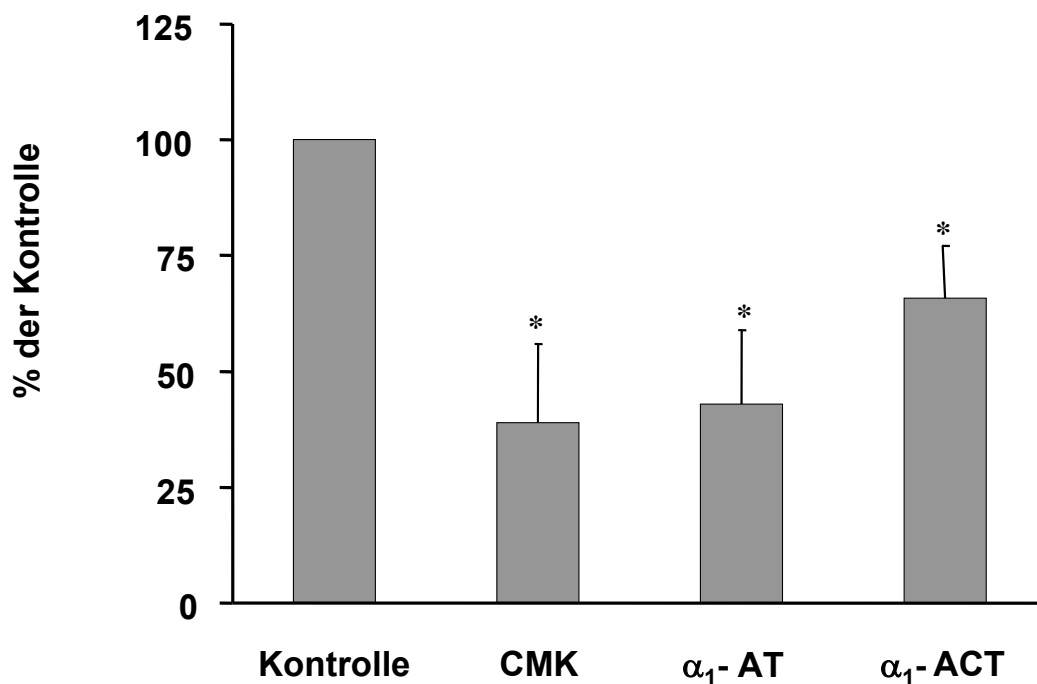


Abb. 21: Hemmung der prokoagulatorischen Aktivität im Gemisch aus isolierten Plättchen und neutrophilen Granulozyten durch CMK (2,5 mM), α_1 -Antitrypsin (20 μ g/ml) und α_1 -Antichymotrypsin (20 μ g/ml). n=6; $p^* < 0,05$ (vs Kontrolle=Plättchen-Neutrophilengemisch mit Kollagen)

3.5.2 Aktivierung der Plättchen durch HNE

Die Hemmung der prokoagulatorischen Aktivität durch die spezifischen Inhibitoren der Neutrophilen Elastase deutete auf eine Beteiligung dieser Protease hin. Zur Bestätigung inkubierten wir isolierte Plättchen mit HNE. Die isolierten Plättchen wurden zuerst 5 Min. bei 37°C im Wasserbad zusammen mit HNE gehalten und anschließend für weitere 5 Min. mit Kollagen stimuliert. Eine Konzentration von 5 µg/ml HNE zeigte eine signifikante Steigerung der Faktor Xa-Bildung (Abb. 22).

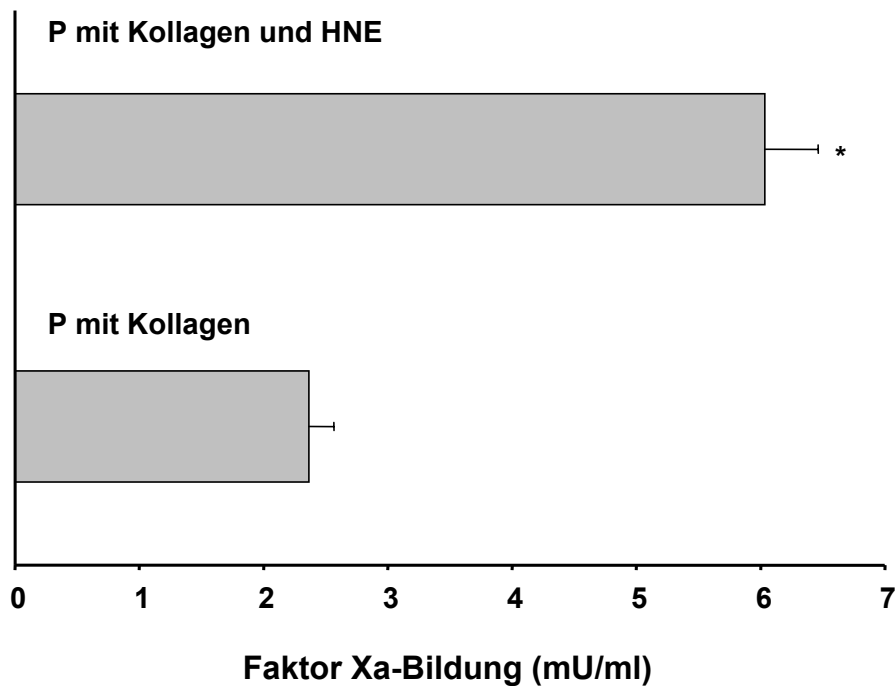


Abb. 22: Isolierte Plättchen wurden mit humaner Neutrophilen Elastase (5 µg/ml) für 5 Min. inkubiert und anschließend mit Kollagen stimuliert. Die Faktor Xa-Bildung wurde nach insgesamt 8 Min. bestimmt. n=3, p*<0,05 (vs. Plättchen mit Kollagen)

3.5.3 Untersuchung zum Einfluß der MMP-9

Anschließend wurde die Wirkung von MMP auf die Gerinnungsaktivierung analysiert. Wir verwendeten einen monoklonalen Antikörper gegen MMP-9, der 5 Min. vor der Stimulation mit Kollagen zu dem Plättchen-Neutrophilengemisch zugegeben wurde. Es zeigte sich, dass Anti-MMP-9 im Gegensatz zu CMK zu keiner Hemmung der Entstehung von Faktor Xa führte (Abb. 23).

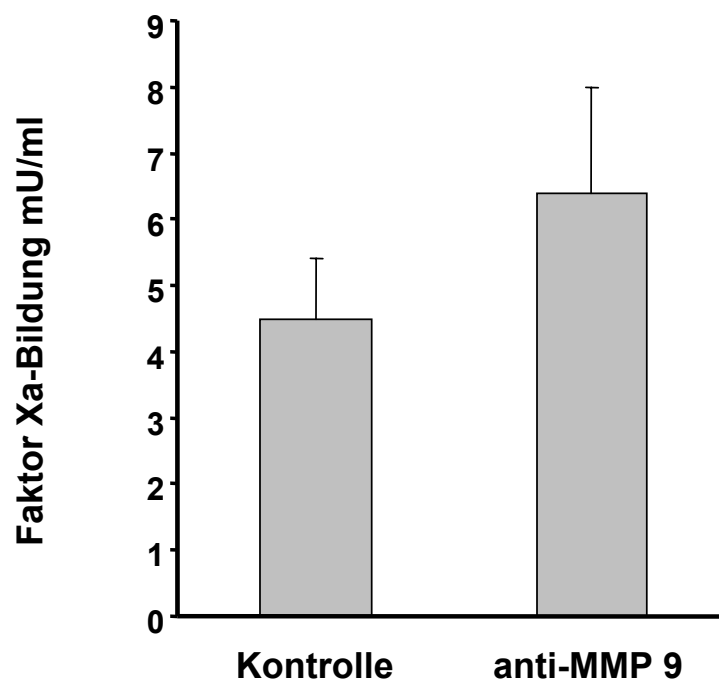


Abb. 23: Zu Gemischen aus isolierten Plättchen und Neutrophilen wurde 5 Min. vor der Stimulation mit Kollagen ein Antikörper gegen MMP-9 (20 μ g/ml) zugegeben. n=3; vs. Kontrolle=isolierte Plättchen plus Neutrophile

3.5.4 Einfluß von Harnsäure und Katalase auf die Gerinnungsaktivität

Da stimulierte Neutrophile neben Proteasen auch freie Radikale freisetzen, untersuchten wir auch deren mögliche Beteiligung an der Stimulierung der prokoagulatorischen Aktivität. Katalase und Harnsäure wurden als Hemmstoffe freier Radikaler eingesetzt und ihre Wirkung auf die Bildung von Faktor Xa überprüft. Beide Inhibitoren wurden vor der Stimulation mit Kollagen zu dem Plättchen-Neutrophilengemisch zugefügt. Sowohl Harnsäure als auch Katalase inhibierten die Faktor Xa-Bildung deutlich (Abb. 24). Insgesamt gesehen lassen die Ergebnisse vermuten, dass die Interaktion von Plättchen mit Neutrophilen über Serinproteasen und Oxidantien zu einer Gerinnungsaktivierung führen könnten.

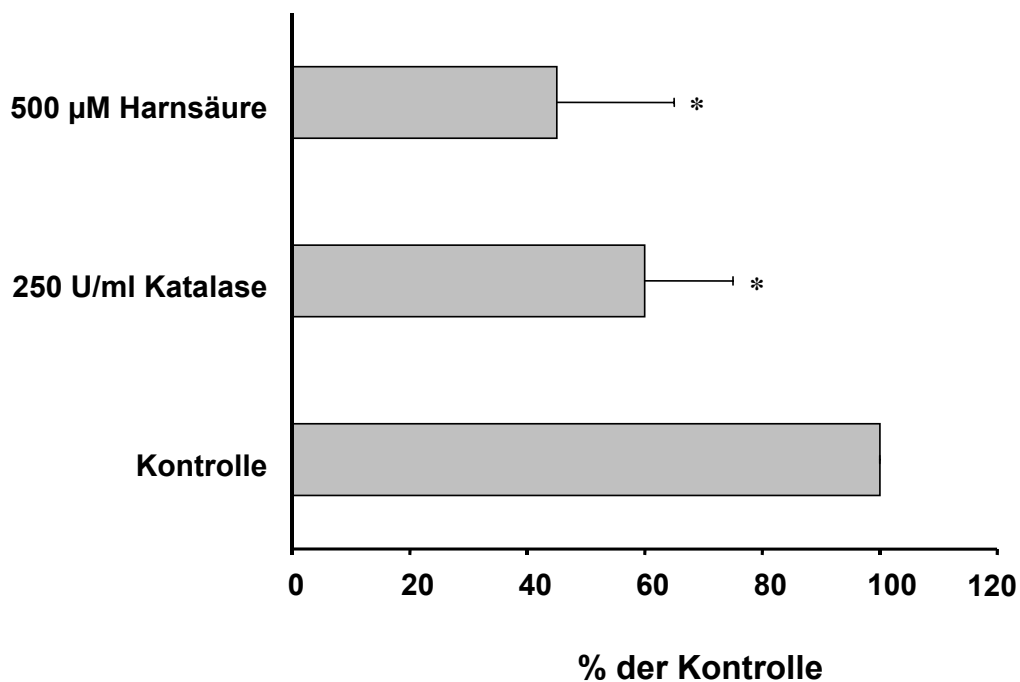


Abb. 24: Die Faktor Xa-Bildung im Plättchen-Neutrophilengemisch wurde durch Harnsäure (500 µM) und Katalase (250 U/ml) gehemmt. n=5; p*<0,05 (vs. stimulierte Plättchen plus Neutrophile alleine)

3.5.5 Faktor X-Aktivität im PÜS

Um den Mechanismus der gerinnungsaktivierenden Interaktion im Plättchen-Neutrophilengemisch weiter zu analysieren, untersuchten wir, ob die auf der Plättchenseite erforderliche Komponente mit dem Zellpellet assoziiert ist oder im PÜS vorhanden ist.

Dazu wurden die Plättchen für 5 Min. bei 37°C im Wasserbad mit Kollagen stimuliert. Dann folgte eine Zentrifugation bei 500 x g für 10 Min. Der PÜS wurde abgenommen und das PP resuspendiert. In Suspensionen aus den beiden Plättchenkomponenten mit Neutrophilen war tendentiell eine höhere Aktivität des PÜS im Vergleich zu dem PP zu erkennen. Interessanterweise hemmte der Elastase-Inhibitor CMK die Faktor Xa-Bildung in Suspensionen des PÜS mit Neutrophilen. Darin sahen wir einen weiteren Hinweis darauf, dass im Plättchenüberstand die gerinnungsaktive Komponente zu finden ist.

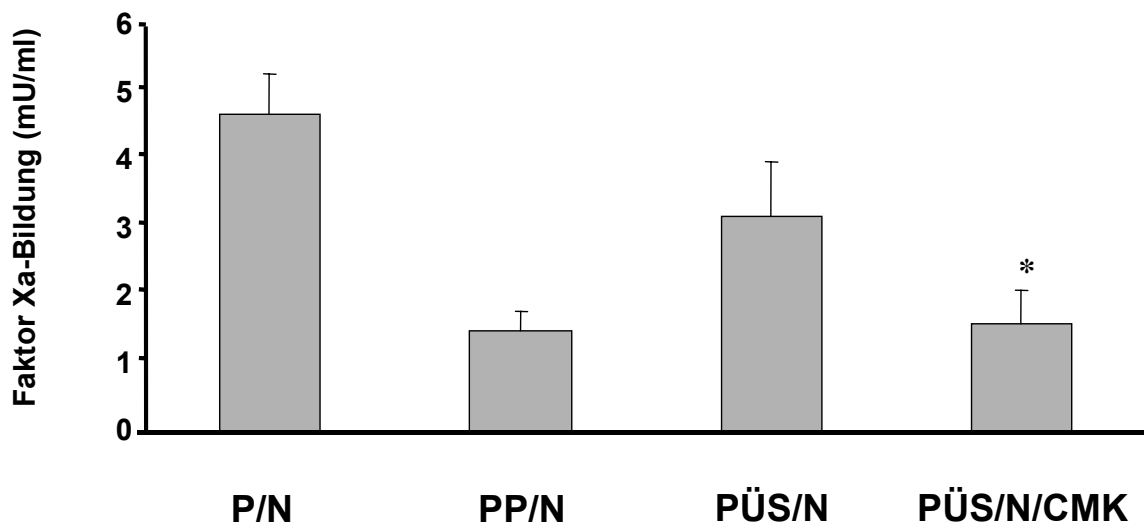


Abb. 25: Die Faktor Xa-Bildung wurde in Suspensionen aus aktivierten Plättchen (P), Plättchenpellet (PP) bzw. Plättchenüberstand (PÜS) im Neutrophilengemisch gemessen. Die Aktivität im PÜS/N konnte durch CMK gehemmt werden. n=3; $p^* < 0,05$ (vs PÜS/N)

3.6 Untersuchungen zur Bedeutung des TFPI

3.6.1 Anstieg der Faktor Xa-Bildung durch anti-TFPI

Die Gerinnung wird gestartet durch den TF/Faktor VIIa-Komplex, der Faktor X aktiviert. Die funktionelle Aktivität des tertiären Komplexes TF/Faktor VIIa/Faktor Xa kann schnell durch den Antagonisten TFPI gehemmt werden. Die Überlegung, ob TF an der Gerinnungsaktivierung in unserem Modell beteiligt ist und durch leukozytäre Proteasen und Oxidantien in einen aktivierten Zustand überführt werden muss, lenkte unsere Aufmerksamkeit auf TFPI. In Anwesenheit eines anti-TFPI - Antikörpers, der spezifisch gegen die mit Faktor Xa interagierende Kunitz-2 Domäne gerichtet ist, kam es zu einer hochsignifikanten Steigerung der prokoagulatorischen Aktivität isolierter Plättchen (Abb. 26).

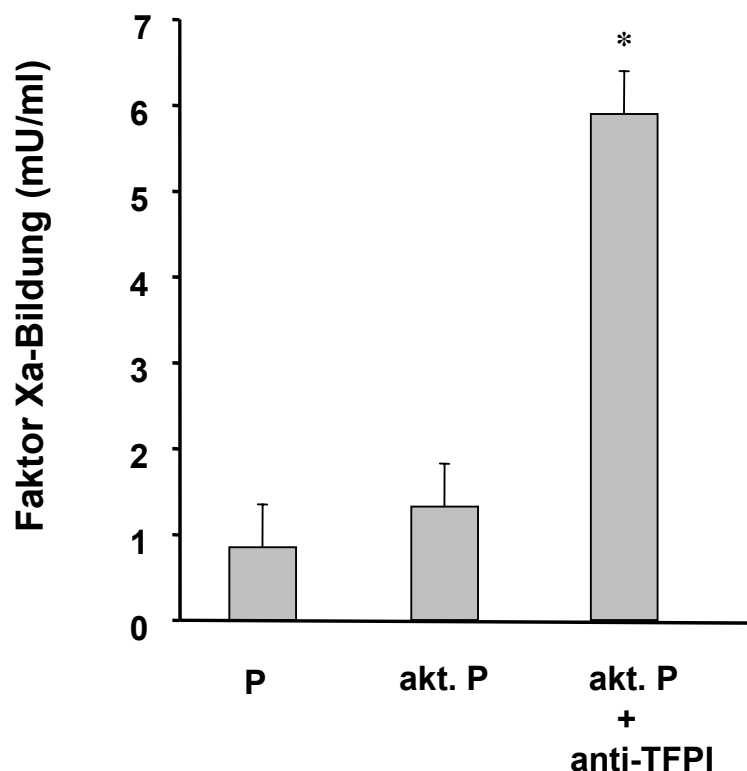


Abb. 26: Zu isolierten und mit Kollagen stimulierten Thrombozyten wurde anti-TFPI-Antikörper (anti-TFPI 04) in einer Konzentration von 100 µg/ml gegeben. n=4; p*<0,05 (vs. isolierte aktivierte Plättchen)

3.6.2 Wirkung von anti-TFPI im Vollblutssystem

Der anti-TFPI -Antikörper wurde auch im Vollblut getestet. In einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ führte der Antikörper gegen die Kunitz-2-Domäne des TFPI zu einer deutlichen Verkürzung der Gerinnungszeit (Abb. 27). In der Steigerung der prokoagulatorischen Aktivität durch Blockade von TFPI sahen wir einen möglichen Hinweis auf die Beteiligung von blutassoziiertem TF auf die Fibrinbildung.

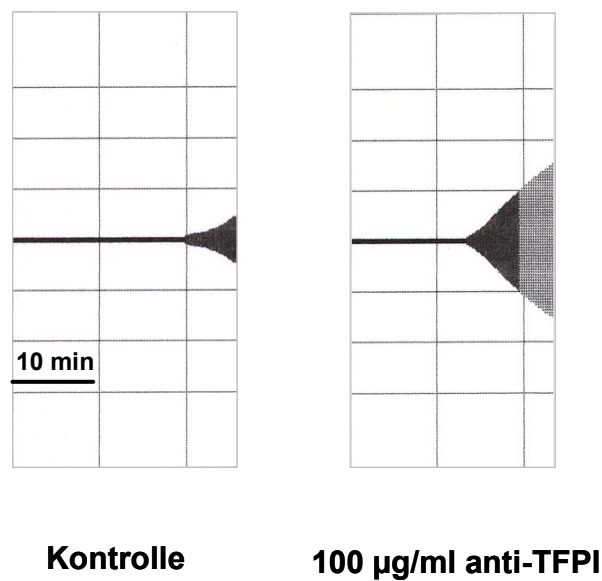


Abb. 27: Unstimuliertes Vollblut (Kontrolle) sowie Vollblut, das mit 100 $\mu\text{g/ml}$ anti-TFPI (04) versetzt wurde.

3.7 MP-assoziiertes TF

3.7.1 TF-Gehalt im Plasma und im MP-freien Plasma

Nachdem unsere initialen Untersuchungen auf eine Beteiligung des TF/VIIa-Komplexes an der Stimulierung der prokoagulatorischen Aktivität hindeuteten, stellten wir uns die Frage nach der Lokalisation des TF im Blut. Um die gerinnungsaktive Komponente im PÜS weiter zu identifizieren, entwickelten wir eine Methode, mit der MP schonend aus PAP isoliert werden konnten. Wir isolierten die MP über mehrere Zentrifugationsschritte und detektierten ihren TF-Gehalt mit einem Double-Sandwich-ELISA. Der TF-Gehalt der MP lag im Mittel bei $46,5 \pm 2,1$ pg/mg Protein ($n=3$). Außerdem bestimmten wir den TF-Gehalt in nativem Plasma sowie in MP-freiem Plasma (Abb. 28). Nach Entfernung der MP war der TF-Gehalt des Plasmas um 70% reduziert.

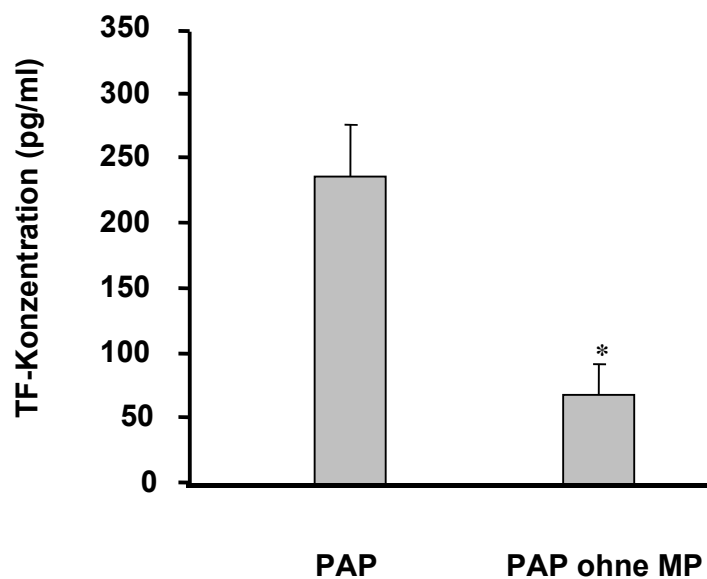


Abb. 28: TF Gehalt von PAP und von PAP, aus dem MP durch Ultrazentrifugation (160 000 x g; 240 Min.) entfernt wurden. $n=4$; $p^*<0,05$ (vs. PAP)

3.7.2 Steigerung der Faktor Xa-Bildung durch MP

Um die funktionelle Relevanz des MP-assoziierten TFs zu beurteilen, bestimmten wir die Faktor Xa-Bildung von MP mit verschiedenen Blutzellen. Die MP wurden in einer Konzentration von 10 µg/50 µl eingesetzt. Die Kollagenstimulation von Plättchen, Neutrophilen und auch der MP alleine führte zu keiner Zunahme der Faktors Xa-Entstehung. Überraschend stark nahm die Faktor Xa-Bildung in Mischungen aus Plättchen, Neutrophilen und MP zu. Dieser Effekt konnte bis zu 66% durch den spezifischen anti-TF-Antikörper Vlc7 gehemmt werden.

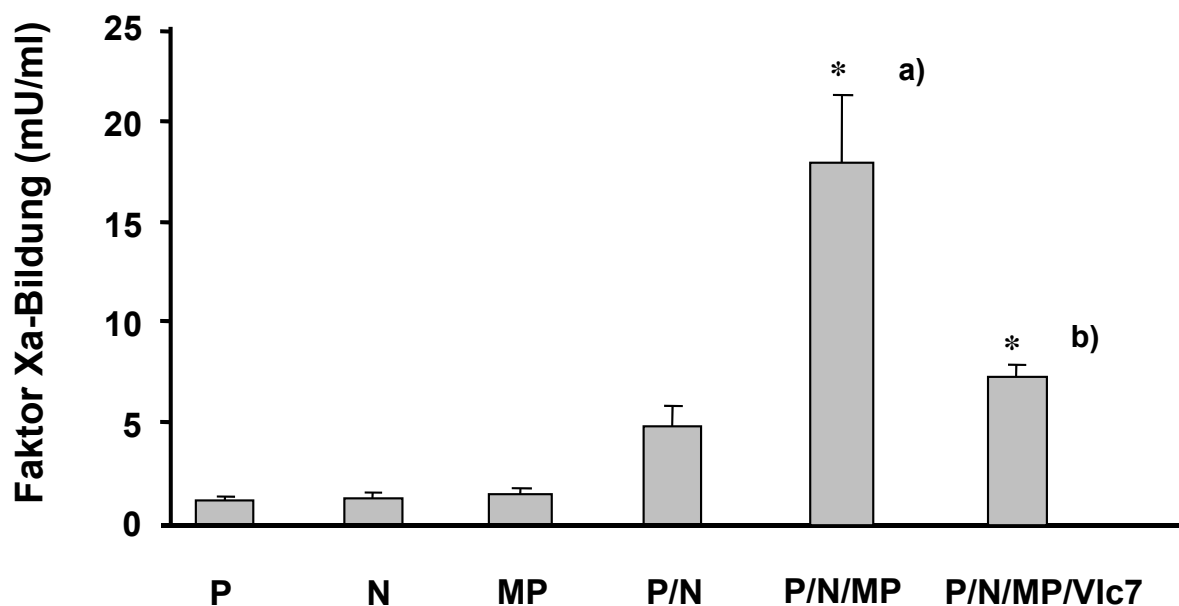


Abb. 29: Prokoagulatorische Aktivität in Suspensionen aus Blutzellen und MP nach Kollagenstimulation. Die Aktivitätssteigerung konnte durch den anti-TF-Antikörper Vlc7 (20 µg/ml) gehemmt werden. n=4; p* < 0,05 (a) vs. Plättchen-Neutrophilengemisch; b) vs. Plättchen-Neutrophilengemisch mit MP)

3.7.3 Effekt von anti-TFPI und MP

Auch die Wirkung des anti-TFPI -Antikörpers auf MP wurde untersucht. Durch die MP alleine wurde die Faktor Xa-Bildung wenig beeinflusst. Die Zugabe von anti-TFPI steigerte die Faktor Xa-Bildung jedoch um das Dreifache. Eine weitere Steigerung ergab sich noch durch die Addition von isolierten Plättchen (Abb. 30).

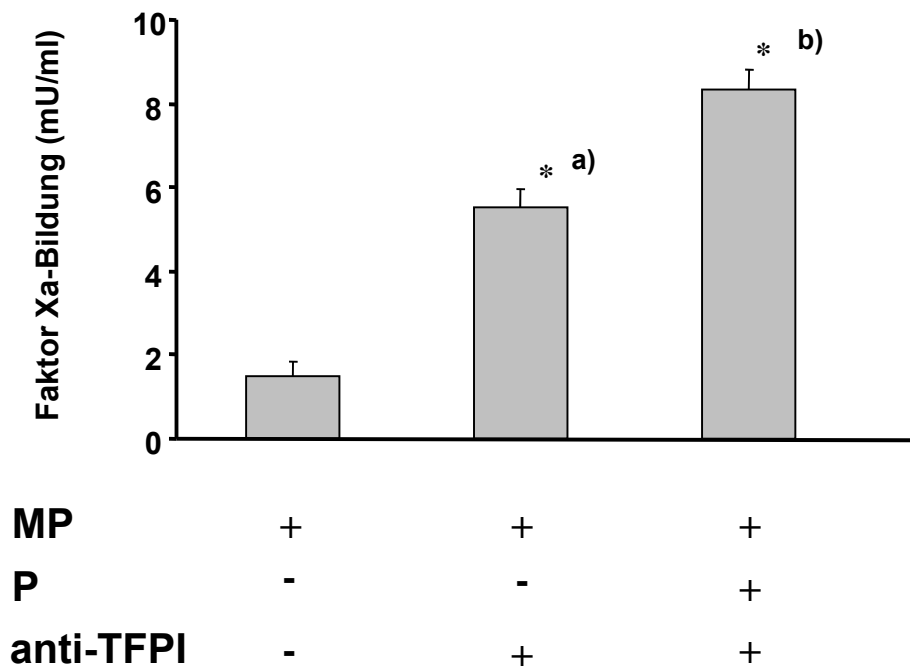


Abb. 30: Der Anti-TFPI-Antikörper (100 $\mu\text{g/ml}$) steigerte die Faktor Xa-Bildung im Gemisch aus Plättchen und MP. $n=3$; $p^*<0,05$ (a) vs. MP; b) vs. MP mit anti-TFPI)

3.7.4 Die Wirkung von MP im Vollblut

Da MP in Plättchen-Neutrophilen-Suspensionen die Gerinnungsaktivität deutlich erhöhten, untersuchten wir ihre Wirkung im Vollblutsystem. In einem Ansatz wurden die MP spezifisch aus dem Vollblut entfernt. In einem weiteren Ansatz fügten wir nach der Separation die entfernten MP wieder zu. Die Gerinnungszeit wurde in dem von den MP befreiten Vollblut deutlich verzögert.

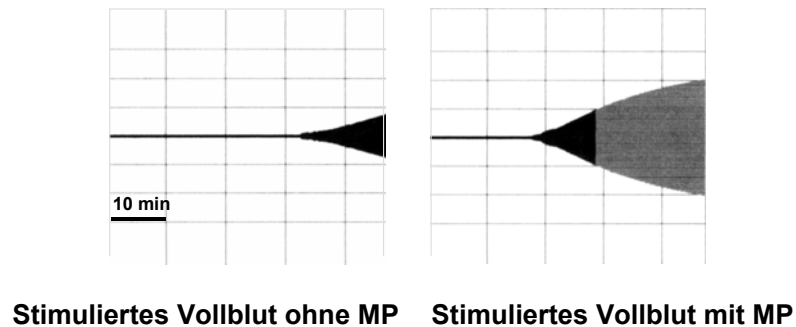


Abb. 31: Gerinnungszeiten von Kollagen stimuliertem Vollblut. In einer Vollblutprobe wurden die MP durch Zentrifugation bei 160 000 x g für 240 Min. entfernt. In der weiteren Probe wurden die zuvor isolierten MP wieder dem MP-verarmten Blut zugefügt.

3.8 Darstellung und Lokalisation der MP im Plättchen-Neutrophilengemisch

Mit Hilfe der Laserscan-Mikroskopie wurde des Weiteren die Interaktion der MP mit Plättchen und Neutrophilen visualisiert. Zunächst beobachteten wir die isolierten und unmarkierten Zellen hinsichtlich ihrer Eigenfluoreszenz. Abb. 32 zeigt isolierte unstimulierte neutrophile Granulozyten (a, b) und Thrombozyten (c, d). Es handelt sich jeweils um denselben Bildausschnitt, nur in einer anderen Darstellungstechnik. Die beiden linken Bilder zeigen die lichtmikroskopischen, die rechten Bilder die Laserscan-Aufnahmen. Die Blutzellen weisen nur eine geringe Eigenfluoreszenz auf (Abb. 32 b, d) und entsprechen somit dem Nullwert des Labels. In der Abb. 32 c erkennt man außerdem, dass die dargestellten Plättchen voll funktionsfähig sind, und nach ca. 20-minütigem Kontakt mit der Glasoberfläche des Objektträgers die bekannten Phänome der Filopodienausbildung und Spreading auftraten.

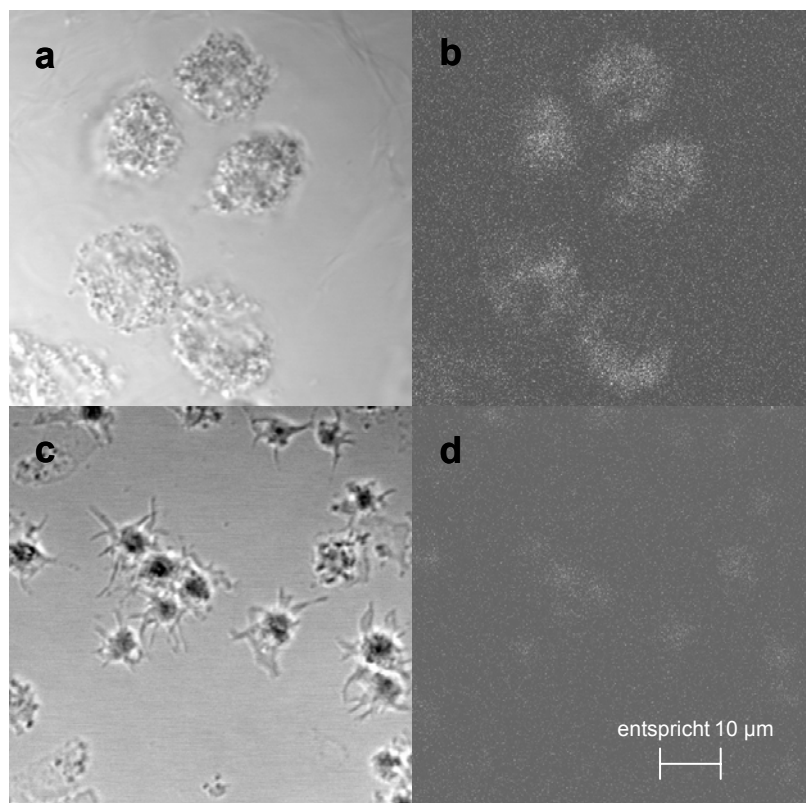


Abb. 32a-d: Mikroskopische Aufnahmen von isolierten unstimulierten Neutrophilen (a,b) und Plättchen (c,d). Abb. b) und d) zeigt die Laserscan Aufnahme der isolierten unmarkierten Zellen.

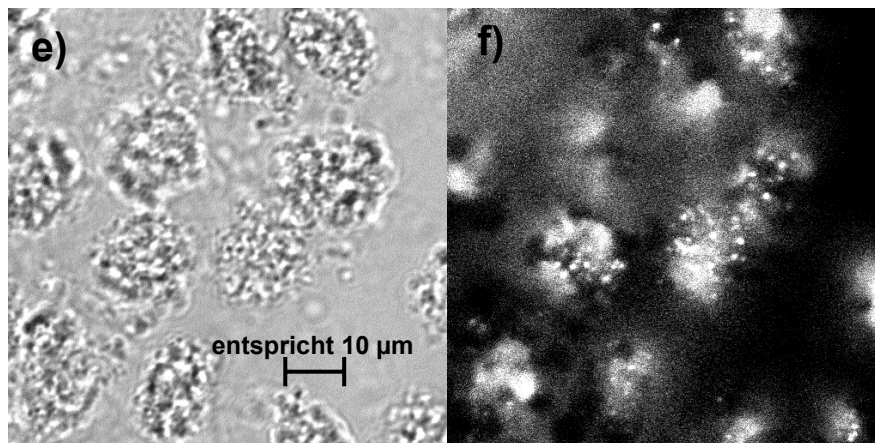


Abb. 32e, f: Mikroskopische Aufnahme von isolierten Plättchen und Neutrophilen zusammen mit Mepacrin markierten MP (e, f). In der Abb. f) ist die Laserscan Aufnahme der Blutzellen mit den fluoreszierenden MP dargestellt. Die MP interagieren direkt und ausgeprägt mit den Zellen.

Anschließend wurden isolierte mit Kollagen stimulierte Plättchen und Neutrophile zusammen mit isolierten, Mepacrin markierten MP (Abb. 32 e, f) dargestellt, um die Lokalisation der MP zu analysieren. Nach der Mepacrinfärbung wurden die MP mit PBS gewaschen, bevor sie zu der Plättchen-Neutrophilensuspension zugegeben wurden. Es ist zu erkennen, dass die fluoreszenzmarkierten MP mit den Plättchen-Neutrophilenkomplexen assoziiert und nicht in den Zwischenräumen lokalisiert sind (Abb. 32 f). Auch das granuläre Fluoreszenzmuster lässt sich gut mit MP vereinbaren. Aufgrund der geringen Größe der MP ist selbst in der Laserscan-Mikroskopie nicht aufzulösen, ob die MP ausschließlich mit den Thrombozyten oder den Neutrophilen interagieren. In der Tat hat sich aber die enge Assoziation der MP mit den Zellkomplexen bestätigt.

4 Diskussion

4.1 Gerinnungsaktivierung durch Kollagenstimulation

Der nach einer Gefäßverletzung drohende Blutverlust wird durch eine schnelle Adhäsion von Thrombozyten an das Subendothel und die nachfolgende Thrombusbildung aus verschiedenen Blutzellen und Fibrin verhindert. Der Gerinnungsaktivierung geht im physiologischen Zustand immer ein Verlust der Gefäßwandintegrität voraus, wodurch extrazelluläre Matrixmoleküle, die normalerweise keinen Kontakt zum Blutsystem haben, freigesetzt werden.

Das zentrale Starterprotein der Gerinnung ist TF [23;66;102], der konstitutiv von verschiedenen Zellen der Gefäßwand, wie z.B. Fibroblasten und glatten Muskelzellen, exprimiert wird [14]. Man ging bisher davon aus, dass Blutzellen TF gewöhnlich nicht exprimieren und die Lokalisation in der Gefäßwand einen sinnvollen Schutz vor Gerinnungsaktivierung in einem intakten Gefäß darstellt. Im menschlichen Blut sind Monozyten der einzige Zelltyp, der TF de novo synthetisieren kann. Diese Neusynthese kann sowohl in vivo als auch in vitro durch Langzeitstimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) beobachtet werden [81]. Überraschenderweise wird jedoch TF auf der Oberfläche von Leukozyten auch nach Kurzzeitstimulation (5-10 min) von Vollblut mit Kollagen gefunden [107]. Im Hinblick auf die kurze Zeitspanne ist es unwahrscheinlich, dass der präsentierte TF erst über Transkription/Translation synthetisiert wird. Die Exposition von TF kann allerdings ohne Kollagenstimulation weder auf Monozyten noch auf Neutrophilen nachgewiesen werden [107]. Die schnelle durch TF induzierte Thrombusbildung nach Stimulation mit Kollagen wurde erstmals von Giesen et al. (1999) [40] gezeigt. Hieraus ergab sich der Begriff des „blood-borne TF“.

Wir beobachteten in unseren Experimenten, dass die 5-minütige Stimulation mit Kollagen (Typ I) zu einer Beschleunigung der Fibrinbildung im Vollblut führte. Kollagenstimulation führte selbst nach Zugabe von CTI, einem spezifischen Inhibitor des Faktors XIIa, der die Beeinflussung des Kontaktaktivierungssystems hemmt, zu einer Steigerung der Fibrinbildung in der TEG. Trotzdem wurden im Vergleich in den Experimenten mit CTI nicht die Fibrinbildungsraten gefunden wie in den Ansätzen ohne Faktor XIIa-Hemmung. Renné et al. [93] haben dazu in ihren Studien gezeigt, dass synergistische Effekte zwischen dem Kontaktaktivierungs- und dem TF/Faktor

VIIa Gerinnungsweg existieren. Da auch in Abwesenheit des Kontaktaktivierungssystems die Gerinnungszeit durch Kollagen gesteigert wurde und durch inaktivierten Faktor VIIa verzögert wurde, war von einer Beteiligung des TF/Faktor VIIa-Komplexes auszugehen. Kurzzeitstimulation mit Kollagen führte auch zur Steigerung der Faktor X-Aktivität in isolierten Plättchen-Neutrophilengemischen. Nach Kollagenstimulation eines isolierten Zellgemisches kam es zu einer signifikanten Steigerung der Faktor Xa-Bildung, die ebenfalls durch inaktivierten Faktor VIIa deutlich gehemmt werden konnte. In der vorliegenden Arbeit begannen wir angesichts dessen die Gerinnungsaktivierung durch Blutzellinteraktionen zu analysieren.

4.2 Auswirkungen einer Kollagenstimulation auf Plättchen und Neutrophile

Nachdem wir im Vollblut und in isolierten Zellgemischen die Gerinnungsstimulation nach kurzer Einwirkung von Kollagen beobachtet hatten, untersuchten wir die prokoagulatorische Wirksamkeit einzelner Blutzellsuspensionen. Isolierte Blutplättchen, Neutrophile und Monozyten alleine zeigten nach Stimulation keine nennenswerte Zunahme der prokoagulatorischen Aktivität. Erst ein Gemisch aus isolierten Thrombozyten und Neutrophilen führte zu einer Gerinnungsaktivierung. Die funktionelle Kompetenz der Plättchen und der Leukozyten scheint daher in Abwesenheit von einer der beiden Komponenten sehr limitiert zu sein. Auch unter experimentellen in vivo Bedingungen interagieren im Thrombus die Plättchen schnell mit verschiedenen Leukozytentypen [64]. Mehrere Studien belegen, dass es in unterschiedlichen Situationen bei Plättchen-Leukozyten-Interaktionen zur Fibrinbildung [53;86] kommt. Außerdem finden sich erhöhte Mengen an Plättchen-Neutrophilen- und Plättchen-Monozyten-Komplexen im Blut von Patienten mit gesteigertem Risiko für thrombotische Erkrankungen, wie z.B. dem Myokardinfarkt [65;72;103].

4.2.1 Gerinnungsaktivierung durch Plättchen-Neutrophilen-Interaktionen

Für die Plättchen-Leukozyten Adhäsion ist ein perfekt passendes Schlüssel-Schloß-Prinzip aus den an der Plättchen Oberfläche verankerten Adhäsionsproteinen und den passenden Rezeptoren auf den Zellmembranen der Leukozyten erforderlich. Der erste Kontakt zwischen den beiden Zellen wird hauptsächlich über die Interaktion des P-Selektins der Plättchen mit dem PSGL-1 der Leukozyten vermittelt. In dieser Konstellation ist initial nur die Aktivierung der Plättchen Voraussetzung zur Adhäsion an Neutrophile und Monozyten. Eine feste Bindung der Plättchen an die Leukozyten wird über Fibrinogenbrücken zwischen dem Plättchenrezeptor GPIIb-IIIa (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) und dem CD 11b/CD18 Zellrezeptor der Neutrophilen (Mac-1) hergestellt [17]. Ein weiterer Adhäsionspartner des Mac-1 auf den aktivierten Plättchen ist GPIb [97;100].

Übereinstimmend damit kam es in unseren Versuchen mit dem GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten Tirofiban zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Faktor Xa-Bildung im Plättchen-Neutrophilengemisch. Die unterschiedliche Wirksamkeit der beiden GPIIb-IIIa-Rezeptor-Antagonisten Tirofiban und Abciximab ließ die Frage offen, warum Abciximab in unserem System nicht zur Hemmung führte. Eine mögliche Erklärung ist, dass in dem von Plättchen und Neutrophilen gebildeten Mikroenvironment die Rezeptorbindungseigenschaften für Abciximab zu stark von denen in vivo abweichen.

Durch die Komplexbildung der beiden Blutzellen wird offensichtlich ein sogenanntes Microenvironment geschaffen, in dem sich die Zellen untereinander aktivieren und Gerinnungsprozesse unter Ausschluss anderer Plasmakomponenten ablaufen können [35]. Sobald Neutrophile aktiviert werden, sezernieren sie Proteasen, Chemokine und freie Sauerstoffradikale, die wiederum stimulierend auf Plättchen wirken können [10;29]. Die leukozytären Produkte verstärken die Aggregation und induzieren die Degranulation von Thrombozyten [46]. Die Inhaltsstoffe der thrombozytären Granula, u. a. ADP, Ca^{2+} , Serotonin, Fibrinogen, vWF, PDGF und Plättchenfaktor 4, stimulieren auf der anderen Seite auch die Leukozyten, so dass mehr freie Radikale ausgeschüttet werden [28;69]. Es könnte daher vermutet werden, dass aus den Freisetzungprodukten der Neutrophilen bzw. der Plättchen die Aktivierung des blutassoziierten TF resultiert.

4.3 Mögliche Lokalisation und Quelle des TF

Unsere Ergebnisse könnten daraufhin deuten, dass die Beteiligung der Plättchen und Neutrophilen für das schnelle Erscheinen von intravasalen TF notwendig ist. Gemäß der kurzen Stimulationsphase wurde angenommen, dass TF bereits präformiert im Blut vorliegen könnte.

Nachdem kein TF in unstimulierten Monozyten oder Neutrophilen detektiert werden konnte, wurden Plättchen auf ihren TF-Gehalt hin analysiert [107]. Überraschenderweise war das TF-Protein in den isolierten Plättchen nachweisbar. Der Hauptspeicherort in den Plättchen lag in den α -Granula und dem „open cannicular system“ [68]. Da in den Thrombozyten und auch den Megakaryozyten keine TF-mRNA gefunden werden konnte, vermuteten wir, dass Plättchen TF von anderen Zellen internalisieren können. Es wäre möglich, dass der von Monozyten exprimierte TF über Mikrovesikel in die Plättchen übertragen wird [27;61;64]. Mikrovesikel sind Abschnürungen von Zellmembranen (MP) oder Zellorganellen (Exosomen), die von Blutzellen unter physiologischen Bedingungen, wie z.B. mechanischem Stress, Zellaktivierung und Apoptose abgegeben werden können. Die aktuelle Arbeit von van der Zee [103] beschreibt, dass P-Selektin und CD63-positive MP ein Marker für Plättchen Aktivierung bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit und Myocardinfarkt sind. Eine Hypothese ist, dass TF beladene MP von aktivierten Monozyten in das Plasma abgegeben und dann von Plättchen aufgenommen werden [27].

Schon Mitte der 90er Jahre zeigten eine Reihe von Beobachtungen die Anwesenheit von TF im Plasma [36]. Weitere Studien lassen vermuten, dass der TF-Gehalt des Plasmas unter pathologischen Bedingungen, die mit einem erhöhten thrombotischen Risiko behaftet sind, ansteigt [54]. Erhöhte Plasma-TF Spiegel wurden in der Tat bei Patienten mit Myokardinfarkt, instabiler Angina pectoris und Diabetes gefunden [101]. In den gleichen Studien konnte auch gezeigt werden, dass das Plasma von gesunden Probanden ebenfalls nachweisbare Mengen TF enthielten.

Wir gingen davon aus, dass der TF im Plasma zum großen Teil assoziiert mit zirkulierenden MP vorliegt. Tatsächlich nahm der TF-Gehalt im Plasma gesunder Probanden nach selektiver Entfernung der MP um ca. 70% ab. Der TF wurde hauptsächlich bei zirkulierenden MP mit einem Durchmesser von >100 nm gefunden

[33]. Die Analyse des TF-Gehaltes der isolierten MP aus plättchenarmen Plasma gesunder Spender ergab eine Konzentration von 46,5 pg/mg Protein.

Physiologischerweise ist der präformierte „full length“ TF offensichtlich hauptsächlich mit den Plättchen und MP assoziiert [68]. Wenn Monozyten unter geeigneten Bedingungen stimuliert werden, exprimieren sie TF und starten die Gerinnung, in dem sie TF präsentieren [81]. Dies ist der Fall bei LPS stimulierter Induktion von monozytärem TF in vitro und wahrscheinlich auch unter pathologischen Bedingungen in vivo, wie z.B. einem Myokardinfarkt [85] und disseminierter intravasaler Gerinnung [79;84]. Monozyten exprimieren TF nach Adhäsion mit der verletzten Gefäßwand sowie durch Interaktion mit anderen aktivierten Blutzellen, wie z. B. Neutrophilen und Plättchen.

Ebenso wird davon ausgegangen, dass die Länge des Stimulus von entscheidender Relevanz für die prokoagulatorische Rolle des TF ist. Für den MP-assoziierten TF wird eine wichtige Rolle während der physiologischen Thrombusbildung und der initialen Phase eines intravasalen Blutpfropfes angenommen. Nach länger andauerndem Reiz (>60 min.) ist der monozytäre TF möglicherweise der entscheidende Vermittler der Thromboseentwicklung [60].

4.4 Aktivierungsmechanismen des MP-assoziierten TF

Isolierte und stimulierte Blutzellen alleine wiesen wie auch isolierte MP keine nennenswerte Faktor X-Aktivität auf, obwohl die Gerinnungszeit in der TEG unter Zugabe von MP deutlich abnahm. In verschiedenen Experimenten schien die prokoagulatorische Aktivität der MP an die Anwesenheit von anderen Blutzellen gebunden zu sein. So stieg im Vollblut und in den Plättchen-Neutrophilengemischen die Faktor Xa-Bildung mit zugefügten MP stark an. Der Effekt war durch einen anti-TF-Antikörper hemmbar. Dies deutet darauf hin, dass der MP-assoziierte TF in einem funktionell inaktiven Zustand vorliegt („encrypted TF“ [3]) und erst aktiviert werden muß. Einen weiteren wichtigen Hinweis lieferte uns die Laserscan-Mikroskopie, mit der wir die Lokalisation der MP in direkter Nachbarschaft der Zellmembranen von Plättchen-Neutrophilen-Komplexen zeigen konnten.

Zusammenfassend lassen diese Experimente vermuten, dass Zell-Zell- und Zell-MP-Interaktionen an der Aktivierung des blutassoziierten TF beteiligt sind.

4.4.1 Mögliche Bedeutung von leukozytären Proteasen und Oxidantien

Die ansteigende Faktor Xa-Bildung in Suspensionen aus isolierten Plättchen, Neutrophilen und MP nach Kollagenstimulierung ist das Ergebnis eines synergistischen Effekts. Kollagen ist ein starker Plättchenagonist und fördert die Adhäsion zwischen Plättchen und Leukozyten (Abb. 32). Beide Zelltypen schütten daraufhin ihre Granulainhaltsstoffe aus, die zu einer weiteren Aktivierung beitragen. Der enge Zell-Zellkontakt, der durch verschiedene Rezeptoren möglich gemacht wird, ist auf der einen Seite ein Schutz vor inhibitorischen Komponenten, auf der anderen Seite eine wichtige Limitierung der Gerinnungsaktivierung (Abb. 33). Das interzelluläre Mikroenvironment bietet den von den Neutrophilen freigesetzten Proteasen Schutz vor frühzeitiger Inaktivierung [26]. Auch ist es durch hohe lokale Konzentrationen der sezernierten Faktoren gekennzeichnet [24]. Den leukozytären Freisetzungprodukten kommt möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der Gerinnung zu. Als eine Konsequenz aus der Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und Plättchen schütten die Leukozyten Oxidantien aus [29] sowie Proteasen und Chemokine. Nach Zugabe von Wasserstoffperoxid konnte ein Anstieg der TF-Aktivität beobachtet werden [88]. Übereinstimmend damit fanden wir eine Hemmung der Faktor X-Aktivität nach Zugabe von Katalase und Harnsäure. Obwohl die Angriffspunkte der freien Radikale noch unklar sind, vermuten wir daher, dass TF selbst oder TFPI den Angriffspunkt von H_2O_2 bilden [59].

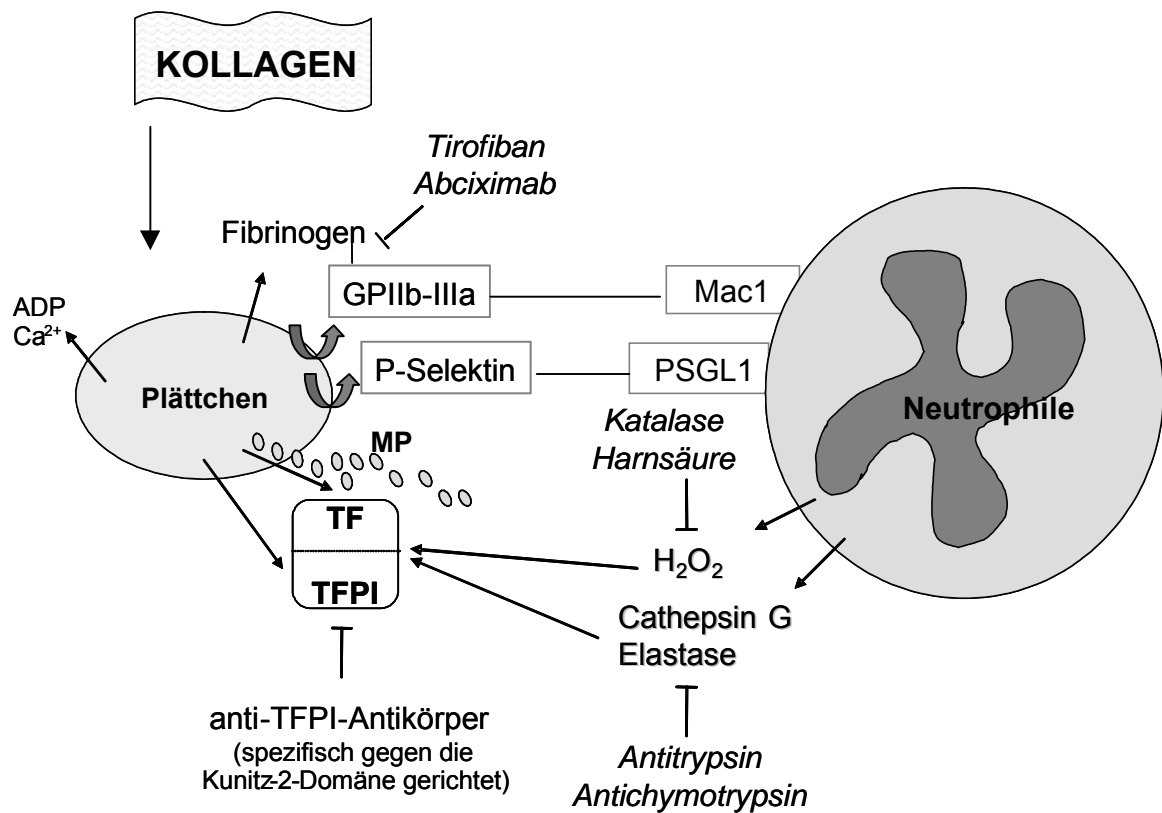


Abb. 33: Modell der Gerinnungsaktivierung von intravasalem TF durch Plättchen-Neutrophilen- bzw. MP-Neutrophilen-Interaktionen gefördert durch die Inaktivierung von TFPI.

4.4.2 Aktivierung von TF durch Inaktivierung von TFPI

Novotny zeigte 1988 [74], dass die Stimulation von Plättchen mit Thrombin zu einer schnellen Sekretion eines Inhibitors der TF Aktivität führte. Dieser Inhibitor ist heute als TFPI bekannt und liegt zum Teil in Plättchen vor [5]. Die funktionelle Aktivität des tertiären Komplexes aus TF/Faktor VIIa/Faktor Xa kann kurzerhand von TFPI durch Bildung eines quaternären Komplexes auf Membranoberflächen gehemmt werden. Die schnelle Sekretion des Inhibitors könnte der Grund dafür sein, dass aktivierte, isolierte Plättchen oder MP nur eine unwesentliche Faktor Xa-Bildung aufwiesen. Einen Hinweis darauf gaben die Experimente mit einem anti-TFPI-Antikörper, der die

Faktor Xa-Bildung isolierter Plättchen deutlich ansteigen ließ. Ebenfalls konnte die prokoagulatorische Aktivität isolierter MP durch den anti-TFPI-Antikörper gesteigert werden. In der TEG bewirkte der anti-TFPI-Antikörper eine deutliche Beschleunigung der Gerinnungszeit.

Wir gehen davon aus, dass die aktivierten Leukozyten Proteasen und Oxidantien ausschütteten, die den quarternären Komplex desintegrieren. HNE ist in der Lage, TFPI zu spalten [44;89]. Die Beobachtungen deuteten auf eine wichtige Rolle der Neutrophilen bei der TF Aktivierung hin. Auch in unseren Experimenten war durch HNE eine deutliche Zunahme der Faktor X-Aktivität nachweisbar. Die Spaltung von TFPI durch Cathepsin G war schwächer als diejenige durch Elastase. Ebenso zeigte der spezifische Cathepsin G-Hemmstoff α_1 -Antichymotrypsin eine geringere Inhibierung der Faktor Xa-Bildung als der stark hemmende Effekt durch α_1 -Antitrypsin. Dagegen hatte ein anti-MMP 9-Antikörper keinen Effekt auf die Faktor Xa-Bildung. An der Inaktivierung des TFPI könnten im übrigen auch die von den Neutrophilen freigesetzten Oxidantien beteiligt sein, sowie andere Proteasen, die wahrscheinlich additiv zu den Serinproteasen wirken.

Die Regulation der TF Aktivität ist im Allgemeinen noch weitgehend ungeklärt. Man vermutet, dass TFPI u. a. über Proteasen-aktivierende Rezeptoren (PAR) die Kontrolle über den TF vermittelten Gerinnungsweg ausübt [1]. PAR sind G-Proteingekoppelte Rezeptoren, die über verschiedene Signalwege in die Gerinnung eingreifen [13].

4.5 Die mögliche physiologische und pathologische Bedeutung des blutassozierten-TF

Für den Beginn der Hämostase ist der TF der Gefäßwand der wichtigste und vielleicht sogar einzige physiologische Initiator der Blutgerinnung. Nach einer Ruptur der Gefäßwand beginnt der Gerinnungsprozess parallel mit der Adhäsion von Plättchen an das Subendothel und der Bildung des TF/Faktor VIIa-Komplexes an aktivierten Zellmembranen. Der TF/Faktor VIIa-Komplex aktiviert den Faktor Xa, wodurch ein Tertiärkomplex formiert wird. Der neu generierte Faktor Xa fügt sich in den Prothrombinasekomplex ein und aktiviert dort Thrombin. Es ist allgemein anerkannt, dass Plättchen eine entscheidende Rolle bei der Thrombinbildung spielen. Weil die Plättchen sich nach einer Gefäßverletzung an die Media und Adventitia

anlagern, kommen sie schnell mit extrazellulären Matrixmolekülen in Verbindung, die im subendotheliale Raum präsentiert sind. Von dieser Plättchenschicht wird vermutet, dass sie eine impermeable Grenze für frisch gebildeten Faktor Xa darstellt und so den Transfer von gebildeten Faktor Xa ins Blut verhindern. Diese Überlegungen machen es unwahrscheinlich, dass der Beginn der Fibrinbildung ausschließlich auf der Oberfläche von in der Gefäßwand lokalisierten Zellen stattfindet. Wir gehen daher davon aus, dass die Gerinnung durch den TF der Gefäßwand gestartet und dann durch die Aktivierung des intravasalen TF während des Thrombuswachstums innerhalb des Blutgefäßes unterstützt wird [33]. Die Anwesenheit von funktionell kompetentem TF auf aktivierten Plättchen und MP würde die Anforderungen an ein solches System erfüllen. Damit kann der gesamte Koagulationsprozess auf der gleichen Zellmembran stattfinden und die Fibrinbildung dort gestartet werden, wo sie aktuell benötigt wird [32].

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass arterielle Verschlüsse durch die Ruptur atherosklerotischer Plaques ausgelöst werden [55]. Der lipidreiche Kern des Plaques wurde als höchster thrombogener Faktor angesehen. Er enthält selbst TF, teilweise in Assoziation mit MP [63]. Die Lipide sind mögliche Aktivatoren des intravasalen TF. Es ist anzunehmen, dass blutassoziiertes TF zu der Stabilität des intravasal wachsenden Thrombus beiträgt. Nachdem ein coronarer Plaque rupturiert ist, formiert sich anfänglich nur ein Thrombus an der verletzten Stelle, verschließt aber nicht das ganze Gefäßlumen. Während dieser Phase, in der sich die Plättchen-Leukozyten Interaktionen im Thrombus etablieren, wird ein starker stimulierender Effekt auf den Blut-TF vermutet. So könnte dieser auch eine Rolle in der letzten und wohl gefährlichsten Phase der Pathogenese der arteriellen Thrombose spielen. Da venöse Thrombosen oft ohne Substanzdefekt des Endothels erfolgen, könnte der intravasale TF auch am pathologischen „Clotting“ in Venen beteiligt sein. Trotz der niedrigen Konzentration der Plättchen in venösen im Gegensatz zu arteriellen Verschlüssen sind Plättchen an sich und ihre MP in der Lage zu massiver Fibrinbildung, wie sie während einer venösen Thrombose beobachtet werden.

Andere TF enthaltenden Komponenten, die wahrscheinlich Anteil an der Fibrinbildung während venöser Thrombosen haben, sind sowohl das verletzte Endothel selbst als auch die adhäsiven Monozyten. Obwohl die TF Beteiligung in der Pathogenese von venösen Thrombosen im Tiermodell bereits demonstriert wurde [45], mangelt es noch an Studien, die die Mitwirkung von TF detaillierter beschreiben.

4.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Gerinnungsaktivierung durch Blutzellinteraktionen und zirkulierende MP vorgestellt. Die Freisetzung von TF über die Aktivierung von Plättchen und die Anwesenheit des Proteins in zirkulierenden MP ermöglicht offensichtlich eine Aktivierung der Blutgerinnung auf einer einzigen Membranoberfläche, die an ein Microenvironment mit Leukozyten gebunden ist. Die Regulationsmechanismen dieser Gerinnungsinitiierung sind komplex und müssen noch detaillierter untersucht werden. Eine Reihe von Fragen, inklusive der Frage nach der Herkunft des TF, der in den Plättchen gespeichert wird, wird noch zu lösen sein. Ebenso ist ungeklärt, welcher Rezeptor für die Bindung der MP an die Blutzellen verantwortlich ist und nicht zuletzt, welche klinische Relevanz dem intravasalen TF für die Genese arterieller und venöser Thrombosen zukommt.

5 Zusammenfassung

TF wird allgemein als der wichtigste Initiator der physiologischen Blutgerinnung angesehen. Nach einer Gefäßruptur tritt TF in Kontakt mit den Blutgerinnungsfaktoren. Dies ermöglicht die Bildung des TF/Faktor VIIa-Komplexes, der die Gerinnungskaskade startet. In der vorliegenden Arbeit wurden Anhaltspunkte für neue Aktivierungs- und Regulationsmechanismen einer intravasalen Gerinnungsaktivierung gewonnen. Wir beobachteten, dass bereits nach 5-minütiger Inkubation von Vollblut mit Kollagen die Fibrinbildungszeit deutlich zunahm. Die Faktor Xa-Bildung in einem Gemisch aus extrinsischen Gerinnungsfaktoren und isolierten Thrombozyten, Monozyten oder Neutrophilen stieg nach Kollagenstimulation allerdings kaum an. Erst die Stimulation mit Kollagen von Plättchen zusammen mit Leukozyten steigerte die Entstehung von Faktor Xa. Andere Gerinnungsstimuli wie z.B. ADP oder Laminin wirkten auf die prokoagulatorische Aktivität nicht so effektiv wie Kollagen. Die Aktivierung mit Kollagen war vergleichbar stark wie die Stimulation mit rekombinantem TF. Wir untersuchten, ob Plättchenantagonisten den Effekt auf die Gerinnung veränderten und konnten zeigen, dass Tirofiban, ein GPIIb-IIIa-Antagonist, zu einer deutlichen Abnahme der Faktor Xa-Bildung führte. Nach unseren Experimenten gingen wir davon aus, dass TF bereits im Plasma vorliegt, u. a. in Form von zirkulierenden MP. Der TF-Gehalt im Plasma gesunder Probanden nahm nach selektiver Entfernung der MP wesentlich ab und damit auch die prokoagulatorische Wirkung. Die isolierten MP wiesen alleine keine Gerinnungsaktivität auf, wohingegen die Faktor Xa-Bildung in Gemischen aus MP und isolierten Blutzellen deutlich zunahm. Der Effekt war durch den Anti-TF-Antikörper Vlc7 hemmbar. Mit Hilfe der Laserscan-Mikroskopie konnten wir eine Assoziation von MP an die Blutzellen darstellen, was nahe legt, dass bei Stimulation zirkulierende MP an diese Blutzellen adhären. So ist ein interzelluläres Mikroenvironment vorstellbar, das die Zellmembranoberflächen der Plättchen, MP und Leukozyten miteinander verbindet. Experimente mit verschiedenen Proteasenhemmstoffen zeigten, dass blutassoziierter TF durch Proteasen der Neutrophilen (HNE, Cathepsin G) stimuliert werden kann. Dabei inaktivieren die Neutrophilenproteasen vermutlich TFPI, den physiologischen Antagonisten von TF, der von aktivierten Plättchen freigesetzt wird. TFPI verhindert die Thrombinentstehung durch Bildung eines quaternären Komplexes mit TF, Faktor VIIa

und Faktor Xa. Diese Komplexierung kann wiederum von den leukozytären Proteasen inhibiert werden. In der Tat wirkte der von uns eingesetzte Antikörper gegen die Kunitz-2-Domäne des TFPI deutlich prokoagulatorisch. Der beschriebene Mechanismus zur Initiierung der Gerinnung limitiert damit die Thrombusentstehung auf das Microenvironment assoziierter MP mit Plättchen und neutrophilen Granulozyten und würde somit vor einer übermäßigen Gerinnungsaktivierung schützen.

6 Literaturverzeichnis

- (1) Ahamed J, Belting M, Ruf W: Regulation of tissue factor-induced signaling by endogenous and recombinant tissue factor pathway inhibitor 1. *Blood* 2005; 105(6):2384-2391.
- (2) Anderson RG: Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(23):10909-10913.
- (3) Bach RR: Tissue factor encryption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(3):456-461.
- (4) Bai H, Ma D, Zhang YG, Zhang N, Kong DS, Guo HS, Mo W, Tang QQ, Song HY: Molecular design and characterization of recombinant long half-life mutants of human tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 2005; 93(6):1055-1060.
- (5) Bajaj MS, Birktoft JJ, Steer SA, Bajaj SP: Structure and biology of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 2001; 86(4):959-972.
- (6) Bajaj MS, Steer S, Kuppuswamy MN, Kisiel W, Bajaj SP: Synthesis and expression of tissue factor pathway inhibitor by serum-stimulated fibroblasts, vascular smooth muscle cells and cardiac myocytes. *Thromb Haemost* 1999; 82(6):1663-1672.
- (7) Banner DW, D'Arcy A, Chene C, Winkler FK, Guha A, Konigsberg WH, Nemerson Y, Kirchhofer D: The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature* 1996; 380(6569):41-46.
- (8) Barry OP, FitzGerald GA: Mechanisms of cellular activation by platelet microparticles. *Thromb Haemost* 1999; 82(2):794-800.
- (9) Bazan JF: Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(18):6934-6938.
- (10) Bazzoni G, Dejana E, Del MA: Platelet-neutrophil interactions. Possible relevance in the pathogenesis of thrombosis and inflammation. *Haematologica* 1991; 76(6):491-499.
- (11) Broze GJ, Jr., Girard TJ, Novotny WF: Regulation of coagulation by a multivalent Kunitz-type inhibitor. *Biochemistry* 1990; 29(33):7539-7546.
- (12) Broze GJ, Jr., Girard TJ, Novotny WF: The lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Prog Hemost Thromb* 1991; 10:243-268.

- (13) Camerer E, Huang W, Coughlin SR: Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(10):5255-5260.
- (14) Camerer E, Kolsto AB, Prydz H: Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res* 1996; 81(1):1-41.
- (15) Camerer E, Rottingen JA, Gjernes E, Larsen K, Skartlien AH, Iversen JG, Prydz H: Coagulation factors VIIa and Xa induce cell signaling leading to up-regulation of the egr-1 gene. *J Biol Chem* 1999; 274(45):32225-32233.
- (16) Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Van V, I, Demunck H, Kasper M, Breier G, Evrard P, Muller M, Risau W, Edgington T, Collen D: Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* 1996; 383(6595):73-75.
- (17) Cerletti C, Evangelista V, de GG: Platelet-polymorphonuclear leukocyte functional interactions: role of adhesive molecules. *Haemostasis* 1996; 26 Suppl 4:20-27.
- (18) Chang CP, Zhao J, Wiedmer T, Sims PJ: Contribution of platelet microparticle formation and granule secretion to the transmembrane migration of phosphatidylserine. *J Biol Chem* 1993; 268(10):7171-7178.
- (19) Chen J, Lopez JA: Interactions of platelets with subendothelium and endothelium. *Microcirculation* 2005; 12(3):235-246.
- (20) Clemetson KJ, Clemetson JM: Molecular pathology of the Bernard-Soulier syndrome, platelet-type von Willebrand's disease and Glanzmann's thrombasthenia. *Beitr Infusionsther* 1993; 31:168-173.
- (21) Crawley J, Lupu F, Westmuckett AD, Severs NJ, Kakkar VV, Lupu C: Expression, localization, and activity of tissue factor pathway inhibitor in normal and atherosclerotic human vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(5):1362-1373.
- (22) Cunningham AC, Hasty KA, Enghild JJ, Mast AE: Structural and functional characterization of tissue factor pathway inhibitor following degradation by matrix metalloproteinase-8. *Biochem J* 2002; 367(Pt 2):451-458.
- (23) Dahlback B: Blood coagulation. *Lancet* 2000; 355(9215):1627-1632.
- (24) de GG, Cerletti C, Evangelista V: Recent advances in platelet-polymorphonuclear leukocyte interaction. *Haemostasis* 1999; 29(1):41-49.
- (25) de GG, Cerletti C, Nanni-Costa MP, Poggi A: The blood platelet as an inflammatory cell. *Eur Respir J Suppl* 1989; 6:441s-445s.
- (26) de GG, Evangelista V, Rajtar G, Del MA, Cerletti C: Activated polymorphonuclear leukocytes stimulate platelet function. *Thromb Res Suppl* 1990; 11:25-32.

- (27) del C, I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, Lopez JA: Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* 2005; 106(5):1604-1611.
- (28) Del MA, Albors M, Evangelista V, Bucchi F, Bertele V, Cerletti C, de GG: Measurement of ionized cytoplasmic calcium mobilization with the photoprotein aequorin in human polymorphonuclear leukocytes activated by platelet activating factor (PAF). *J Lipid Mediat* 1989; 1(1):25-36.
- (29) Del MA, Evangelista V, Rajtar G, Chen ZM, Cerletti C, de GG: Platelet activation by polymorphonuclear leukocytes exposed to chemotactic agents. *Am J Physiol* 1990; 258(3 Pt 2):H870-H879.
- (30) Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS: Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 1989; 134(5):1087-1097.
- (31) Edgington TS, Mackman N, Brand K, Ruf W: The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb Haemost* 1991; 66(1):67-79.
- (32) Engelmann B: Initiation of coagulation by tissue factor carriers in blood. *Blood Cells Mol Dis* 2006; 36(2):188-190.
- (33) Engelmann B, Luther T, Muller I: Intravascular tissue factor pathway--a model for rapid initiation of coagulation within the blood vessel. *Thromb Haemost* 2003; 89(1):3-8.
- (34) Enjyoji K, Miyata T, Kamikubo Y, Kato H: Effect of heparin on the inhibition of factor Xa by tissue factor pathway inhibitor: a segment, Gly212-Phe243, of the third Kunitz domain is a heparin-binding site. *Biochemistry* 1995; 34(17):5725-5735.
- (35) Evangelista V, Rajtar G, de GG, White JG, Cerletti C: Platelet activation by fMLP-stimulated polymorphonuclear leukocytes: the activity of cathepsin G is not prevented by antiproteases. *Blood* 1991; 77(11):2379-2388.
- (36) Fareed J, Callas DD, Hoppensteadt D, Bermes EW, Jr.: Tissue factor antigen levels in various biological fluids. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995; 6 Suppl 1:S32-S36.
- (37) Gailani D, Broze GJ, Jr.: Factor XII-independent activation of factor XI in plasma: effects of sulfatides on tissue factor-induced coagulation. *Blood* 1993; 82(3):813-819.
- (38) Gawaz M, Ruf A, Pogatsa-Murray G, Dickfeld T, Rudiger S, Taubitz W, Fischer J, Muller I, Meier D, Patscheke H, Schomig A: Incomplete inhibition of platelet aggregation and glycoprotein IIb-IIIa receptor blockade by abciximab: importance of internal pool of glycoprotein IIb-IIIa receptors. *Thromb Haemost* 2000; 83(6):915-922.
- (39) Gerrard JM, McNicol A: Platelet storage pool deficiency, leukemia, and myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 1992; 8(4-5):277-281.

- (40) Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roque M, Fallon JT, Badimon JJ, Himber J, Riederer MA, Nemerson Y: Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(5):2311-2315.
- (41) Girard TJ, Warren LA, Novotny WF, Likert KM, Brown SG, Miletich JP, Broze GJ, Jr.: Functional significance of the Kunitz-type inhibitory domains of lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Nature* 1989; 338(6215):518-520.
- (42) Girolami A, Randi ML, Gavasso S, Lombardi AM, Spiezia F: The occasional venous thromboses seen in patients with severe (homozygous) FXII deficiency are probably due to associated risk factors: a study of prevalence in 21 patients and review of the literature. *J Thromb Thrombolysis* 2004; 17(2):139-143.
- (43) Grabowski EF, Reininger AJ, Petteruti PG, Tsukurov O, Orkin RW: Shear stress decreases endothelial cell tissue factor activity by augmenting secretion of tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21(1):157-162.
- (44) Higuchi DA, Wun TC, Likert KM, Broze GJ, Jr.: The effect of leukocyte elastase on tissue factor pathway inhibitor. *Blood* 1992; 79(7):1712-1719.
- (45) Himber J, Wohlgensinger C, Roux S, Damico LA, Fallon JT, Kirchhofer D, Nemerson Y, Riederer MA: Inhibition of tissue factor limits the growth of venous thrombus in the rabbit. *J Thromb Haemost* 2003; 1(5):889-895.
- (46) Hu H, Varon D, Hjemdahl P, Savion N, Schulman S, Li N: Platelet-leukocyte aggregation under shear stress: differential involvement of selectins and integrins. *Thromb Haemost* 2003; 90(4):679-687.
- (47) Huang ZF, Higuchi D, Lasky N, Broze GJ, Jr.: Tissue factor pathway inhibitor gene disruption produces intrauterine lethality in mice. *Blood* 1997; 90(3):944-951.
- (48) Johne J, Blume C, Benz PM, Pozgajova M, Ullrich M, Schuh K, Nieswandt B, Walter U, Renne T: Platelets promote coagulation factor XII-mediated proteolytic cascade systems in plasma. *Biol Chem* 2006; 387(2):173-178.
- (49) Kalafatis M, Xue J, Lawler CM, Mann KG: Contribution of the heavy and light chains of factor Va to the interaction with factor Xa. *Biochemistry* 1994; 33(21):6538-6545.
- (50) Kao FT, Hartz J, Horton R, Nemerson Y, Carson SD: Regional assignment of human tissue factor gene (F3) to chromosome 1p21-p22. *Somat Cell Mol Genet* 1988; 14(4):407-410.
- (51) Kato K, Kanaji T, Russell S, Kunicki TJ, Furihata K, Kanaji S, Marchese P, Reininger A, Ruggeri ZM, Ware J: The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion. *Blood* 2003; 102(5):1701-1707.
- (52) Kienast J, Ostermann H: [Blood coagulation and fibrinolysis]. *Z Kardiol* 1993; 82 Suppl 2:65-69.

- (53) Kirchhofer D, Sakariassen KS, Clozel M, Tschopp TB, Hadvary P, Nemerson Y, Baumgartner HR: Relationship between tissue factor expression and deposition of fibrin, platelets, and leukocytes on cultured endothelial cells under venous blood flow conditions. *Blood* 1993; 81(8):2050-2058.
- (54) Koyama T, Nishida K, Ohdama S, Sawada M, Murakami N, Hirosawa S, Kuriyama R, Matsuzawa K, Hasegawa R, Aoki N: Determination of plasma tissue factor antigen and its clinical significance. *Br J Haematol* 1994; 87(2):343-347.
- (55) Libby P: Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med* 2000; 247(3):349-358.
- (56) Lopez JA, Andrews RK, fshar-Kharghan V, Berndt MC: Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 1998; 91(12):4397-4418.
- (57) Lupu C, Goodwin CA, Westmuckett AD, Emeis JJ, Scully MF, Kakkar VV, Lupu F: Tissue factor pathway inhibitor in endothelial cells colocalizes with glycolipid microdomains/caveolae. Regulatory mechanism(s) of the anticoagulant properties of the endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(11):2964-2974.
- (58) Lupu C, Poulsen E, Roquefeuil S, Westmuckett AD, Kakkar VV, Lupu F: Cellular effects of heparin on the production and release of tissue factor pathway inhibitor in human endothelial cells in culture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(9):2251-2262.
- (59) Lwaleed BA, Bass PS: Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease. *J Pathol* 2006; 208(3):327-339.
- (60) Lwaleed BA, Bass PS, Cooper AJ: The biology and tumour-related properties of monocyte tissue factor. *J Pathol* 2001; 193(1):3-12.
- (61) Mack M, Kleinschmidt A, Bruhl H, Klier C, Nelson PJ, Cihak J, Plachy J, Stangassinger M, Erfle V, Schlondorff D: Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat Med* 2000; 6(7):769-775.
- (62) Mackman N, Morrissey JH, Fowler B, Edgington TS: Complete sequence of the human tissue factor gene, a highly regulated cellular receptor that initiates the coagulation protease cascade. *Biochemistry* 1989; 28(4):1755-1762.
- (63) Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A: Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 1999; 99(3):348-353.
- (64) McEver RP: Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thromb Haemost* 2001; 86(3):746-756.

- (65) Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI: Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; 104(13):1533-1537.
- (66) Morrissey JH: Tissue factor: an enzyme cofactor and a true receptor. *Thromb Haemost* 2001; 86(1):66-74.
- (67) Morrissey JH, Fakhrai H, Edgington TS: Molecular cloning of the cDNA for tissue factor, the cellular receptor for the initiation of the coagulation protease cascade. *Cell* 1987; 50(1):129-135.
- (68) Muller I, Klocke A, Alex M, Kotsch M, Luther T, Morgenstern E, Zieseniss S, Zahler S, Preissner K, Engelmann B: Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J* 2003; 17(3):476-478.
- (69) Nagata K, Tsuji T, Todoroki N, Katagiri Y, Tanoue K, Yamazaki H, Hanai N, Irimura T: Activated platelets induce superoxide anion release by monocytes and neutrophils through P-selectin (CD62). *J Immunol* 1993; 151(6):3267-3273.
- (70) Nemerson Y, Bach R: Tissue factor revisited. *Prog Hemost Thromb* 1982; 6:237-261.
- (71) Nieswandt B, Watson SP: Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 2003; 102(2):449-461.
- (72) Nijm J, Wikby A, Tompa A, Olsson AG, Jonasson L: Circulating levels of proinflammatory cytokines and neutrophil-platelet aggregates in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2005; 95(4):452-456.
- (73) Novotny WF: Tissue factor pathway inhibitor. *Semin Thromb Hemost* 1994; 20(1):101-108.
- (74) Novotny WF, Girard TJ, Miletich JP, Broze GJ, Jr.: Platelets secrete a coagulation inhibitor functionally and antigenically similar to the lipoprotein associated coagulation inhibitor. *Blood* 1988; 72(6):2020-2025.
- (75) Nurden AT: New thoughts on strategies for modulating platelet function through the inhibition of surface receptors. *Haemostasis* 1996; 26 Suppl 4:78-88.
- (76) Nurden AT, Caen JP: Specific roles for platelet surface glycoproteins in platelet function. *Nature* 1975; 255(5511):720-722.
- (77) Nurden AT, Poujol C, Nurden P: Different activation states of GP IIb/IIIa complexes in platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1999; 10 Suppl 1:S67-S70.
- (78) Ostergaard P, Nordfang O, Petersen LC, Valentin S, Kristensen H: Is tissue factor pathway inhibitor involved in the antithrombotic effect of heparins? Biochemical considerations. *Haemostasis* 1993; 23 Suppl 1:107-111.

- (79) Osterud B: Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathophysiological roles. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; 9 Suppl 1:S9-14.
- (80) Osterud B: Tissue factor expression in monocytes: in vitro compared to ex vivo. *Thromb Haemost* 2000; 84(3):521-522.
- (81) Osterud B: The role of platelets in decrypting monocyte tissue factor. *Semin Hematol* 2001; 38(4 Suppl 12):2-5.
- (82) Osterud B: The role of platelets in decrypting monocyte tissue factor. *Dis Mon* 2003; 49(1):7-13.
- (83) Osterud B, Bajaj MS, Bajaj SP: Sites of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and tissue factor expression under physiologic and pathologic conditions. On behalf of the Subcommittee on Tissue factor Pathway Inhibitor (TFPI) of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995; 73(5):873-875.
- (84) Osterud B, Bjorklid E: The tissue factor pathway in disseminated intravascular coagulation. *Semin Thromb Hemost* 2001; 27(6):605-617.
- (85) Ott I, Neumann FJ, Gawaz M, Schmitt M, Schomig A: Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation* 1996; 94(6):1239-1246.
- (86) Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, Sajer SA, Furie B: Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* 1992; 359(6398):848-851.
- (87) Pedersen AH, Nordfang O, Norris F, Wiberg FC, Christensen PM, Moeller KB, Meidahl-Pedersen J, Beck TC, Norris K, Hedner U, .: Recombinant human extrinsic pathway inhibitor. Production, isolation, and characterization of its inhibitory activity on tissue factor-initiated coagulation reactions. *J Biol Chem* 1990; 265(28):16786-16793.
- (88) Penn MS, Patel CV, Cui MZ, DiCorleto PE, Chisolm GM: LDL increases inactive tissue factor on vascular smooth muscle cell surfaces: hydrogen peroxide activates latent cell surface tissue factor. *Circulation* 1999; 99(13):1753-1759.
- (89) Petersen LC, Bjorn SE, Nordfang O: Effect of leukocyte proteinases on tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 1992; 67(5):537-541.
- (90) Prydz H, Camerer E, Rottingen JA, Wiiger MT, Gjernes E: Cellular consequences of the initiation of blood coagulation. *Thromb Haemost* 1999; 82(2):183-192.
- (91) Rapaport SI: The extrinsic pathway inhibitor: a regulator of tissue factor-dependent blood coagulation. *Thromb Haemost* 1991; 66(1):6-15.
- (92) Rapaport SI, Rao LV: Initiation and regulation of tissue factor-dependent blood coagulation. *Arterioscler Thromb* 1992; 12(10):1111-1121.

- (93) Renne T, Pozgajova M, Gruner S, Schuh K, Pauer HU, Burfeind P, Gailani D, Nieswandt B: Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med* 2005; 202(2):271-281.
- (94) Ross R, Glomset JA: The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med* 1976; 295(7):369-377.
- (95) Ross R, Glomset JA: The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *N Engl J Med* 1976; 295(8):420-425.
- (96) Sanders NL, Bajaj SP, Zivelin A, Rapaport SI: Inhibition of tissue factor/factor VIIa activity in plasma requires factor X and an additional plasma component. *Blood* 1985; 66(1):204-212.
- (97) Santoso S, Sachs UJ, Kroll H, Linder M, Ruf A, Preissner KT, Chavakis T: The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1. *J Exp Med* 2002; 196(5):679-691.
- (98) Savage B, mus-Jacobs F, Ruggeri ZM: Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 1998; 94(5):657-666.
- (99) Simionescu M, Simionescu N: Endothelial transport of macromolecules: transcytosis and endocytosis. A look from cell biology. *Cell Biol Rev* 1991; 25(1):1-78.
- (100) Simon DI, Chen Z, Xu H, Li CQ, Dong J, McIntire LV, Ballantyne CM, Zhang L, Furman MI, Berndt MC, Lopez JA: Platelet glycoprotein Iba1 is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Exp Med* 2000; 192(2):193-204.
- (101) Steppich B, Mattisek C, Sobczyk D, Kastrati A, Schomig A, Ott I: Tissue factor pathway inhibitor on circulating microparticles in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2005; 93(1):35-39.
- (102) Tilley R, Mackman N: Tissue factor in hemostasis and thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32(1):5-10.
- (103) van der Zee PM, Biro E, Ko Y, de Winter RJ, Hack CE, Sturk A, Nieuwland R: P-selectin- and CD63-exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripheral arterial disease and myocardial infarction. *Clin Chem* 2006; 52(4):657-664.
- (104) Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D: Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(8):2839-2843.
- (105) Wun TC, Kretzmer KK, Girard TJ, Miletich JP, Broze GJ, Jr.: Cloning and characterization of a cDNA coding for the lipoprotein-associated coagulation inhibitor shows that it consists of three tandem Kunitz-type inhibitory domains. *J Biol Chem* 1988; 263(13):6001-6004.

- (106) Zablocki JA, Miyano M, Garland RB, Pireh D, Schretzman L, Rao SN, Lindmark RJ, Panzer-Knodle SG, Nicholson NS, Taite BB, .: Potent in vitro and in vivo inhibitors of platelet aggregation based upon the Arg-Gly-Asp-Phe sequence of fibrinogen. A proposal on the nature of the binding interaction between the Arg-guanidine of RGD_X mimetics and the platelet GP IIb-IIIa receptor. *J Med Chem* 1993; 36(13):1811-1819.
- (107) Zillmann A, Luther T, Muller I, Kotzsch M, Spannagl M, Kauke T, Oelschlagel U, Zahler S, Engelmann B: Platelet-associated tissue factor contributes to the collagen-triggered activation of blood coagulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281(2):603-609.

7 Anhang

7.1 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernd Engelmann für die Bereitstellung des interessanten Themas und seine engagierte, intensive Betreuung während der gesamten Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Pohl danke ich für die Möglichkeit, dass ich die Experimente für die vorliegende Arbeit am Physiologischen Institut der LMU München durchführen durfte.

Ganz herzlich möchte ich Herrn Priv. Doz. Dr. Michael Spannagl danken, der meine Arbeit in jeder Hinsicht unterstützt hat und mir viele wertvolle Anregungen gegeben hat.

Außerdem danke ich Herrn Priv. Doz. Dr. Thomas Luther und dem Institut für Pathologie in Dresden für die hilfreiche Kooperation im Bereich der Double-Sandwich-ELISA Technik.

Bedanken möchte ich mich auch ganz besonders bei allen Mitdoktoranden und Kollegen im Physiologischen Institut, insbesondere unserer Arbeitsgruppe, für die geduldige Einlernphase, die stetige Hilfe bei Problemen und die freundschaftliche Atmosphäre.

Ein großes Dankeschön geht an meine Familie, die mich während meiner Ausbildung immer unterstützt und ermutigt hat.

7.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Teresa Kauke
Geburtsdatum	05. Mai 1976
Geburtsort	Plettenberg
Familienstand	ledig, keine Kinder
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	evangelisch

Schulbildung

1982-86	Martin-Luther Grundschule, Plettenberg
1986-92	Albert-Schweitzer-Gymnasium, Plettenberg
1992-96	St. Ursula-Gymnasium, Attendorn
06.1996	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

10.1996-04.1997	Studium der Germanistik und Theologie, Universität Bielefeld
05.1997-11.2004	Studium der Humanmedizin an der LMU München
08.1999	Physikum
08.2001	1. Staatsexamen
08.2003	2. Staatsexamen
10.2003-09.2004	Praktisches Jahr
11.2004	3. Staatsexamen
	Approbation als Ärztin

Berufliche Tätigkeit

Seit 12.2004	Assistenzärztin an der Universitätsklinik München, Klinik für Anästhesiologie Abteilung für Transfusionsmedizin und Hämostaseologie Labor für Immungenetik
--------------	---

Dissertation

Seit 1999	Doktorarbeit am Physiologischen Institut der LMU München „Untersuchungen zur initialen Gerinnungsaktivierung durch Blutzellinteraktionen und zirkulierende Mikropartikel“ Experimenteller Teil 1999-2001
-----------	---