

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München im Klinikum Großhadern

Direktor: Prof. Dr. Daniel Teupser

Eosinophile Granulozyten als Träger von intravaskulärem *tissue factor* (TF)

Bedeutung bei Gerinnungsprozessen und Signaltransduktion

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

vorgelegt von

Christine Zillmann

aus

Rosenheim

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. B. Engelmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Bernhard Heindl
Priv. Doz. Dr. Michael Fiegl
Priv. Doz. Dr. Christian Straka
Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Schramm

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2012

Inhalt

Aus dieser Promotionsarbeit hervorgegangene Publikationen:	5
Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellen	8
I. Tissue factor (TF) – Bedeutung in der Blutgerinnung und darüber hinaus.....	9
1. Gerinnungsforschung in den letzten 2000 Jahren	9
2. Vom Gen zum Protein	11
3. TF und Embryogenese.....	12
4. Verteilung von TF im Gewebe	13
5. TF als Starterprotein der Gerinnung	14
6. TF-Encryption	16
7. TF – gerinnungsunabhängige Funktionen	16
a. TF-abhängige Signaltransduktion	16
b. TF und Zellmigration	17
c. Metastasierung, Tumorwachstum und Angiogenese.....	18
d. Entzündungsprozesse	19
II. Charakterisierung eosinophiler Granulozyten	20
1. Morphologie	20
2. Vorkommen	21
3. Entwicklung.....	22
4. Funktion.....	23
a. Zytotoxische Proteine in den spezifischen Granula	23
b. Antigen-Präsentation	24
c. Mastzell-Aktivierung	24
d. Parasitäre Erkrankungen	25
e. Asthma bronchiale.....	25
f. Hypereosinophiles Syndrom (HES)	26
Fragestellung	28
III. Material/Methoden	29
1. Spender	29
2. Blut- und Zellpräparation	29
a. Blutentnahme	29
b. Eosinophilen-Isolation aus Vollblut.....	29
c. Bestimmung der Zellzahl und Viabilität	31
d. Bestimmung der Reinheit der Zellsuspension.....	32
e. Monozyten- und Lymphozyten-Isolation.....	32
f. LPS-Stimulation von Monozyten.....	32
g. Thrombozyten-Isolation	33
3. Bestimmung von Eosinophil Cationic Protein (ECP)	33
4. Elektronenmikroskopie.....	34
a. Präparation und Einbettung der Zellen.....	35
b. Immunolabelling der Ultradünnschnitte.....	36
5. Double Sandwich ELISA	36
6. Flowzytometrie mit stimulierten Eosinophilen	37
7. Faktor Xa-Bildung.....	39
8. Real Time PCR.....	40
9. Thrombelastographie	42
10. Transmigrationskammer.....	44
11. Materialien/Puffer	47

IV.	Ergebnisse.....	50
1.	Nachweis von TF in hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark.....	50
2.	Expression von TF in reifen Eosinophilen im peripheren Blut.....	54
3.	Aktivierung von isolierten Eosinophilen durch GMCSF/PAF.....	57
4.	Aktivierung der TF-Synthese in isolierten Eosinophilen durch Stimulation mit GMCSF/PAF.....	58
5.	TF-Präsentation auf der Oberfläche von isolierten Eosinophilen	60
6.	Funktionelle Aktivität des Eosinophilen-TF	64
7.	Anti-TF hemmt die Transmigration von isolierten Eosinophilen durch das Endothel	66
V.	Diskussion	70
1.	Intravaskulärer TF	70
2.	Ursprung des Eosinophilen-TF – <i>de novo</i> Synthese?.....	72
3.	Präsentation von Eosinophilen-TF nach Aktivierung	73
4.	TF auf Eosinophilen– prokoagulatorische Aktivität	74
5.	TF auf Eosinophilen - Transmigration	75
6.	TF auf Eosinophilen – potentielle Bedeutung bei Eosinophilen-assoziierten Krankheiten	77
a.	Autoimmunerkrankungen der Haut.....	77
b.	Asthma bronchiale.....	79
c.	Idiopathisches hypereosinophiles Syndrom (HES).....	80
d.	Atherosklerose – koronare Herzkrankheit.....	81
7.	Ausblick.....	83
VI.	Zusammenfassung	84
	Literaturverzeichnis.....	85
	Danksagung.....	101

Aus dieser Promotionsarbeit hervorgegangene Publikationen:

Moosbauer C, Morgenstern E, Cuvelier SL, Manukyan D, Bidzhekov K, Albrecht S, Lohse P, Patel KD, Engelmann B.

Eosinophils are a major intravascular location for tissue factor storage and exposure.
Blood 109:995-1002 (2007)

Leon C, Alex M, Klocke A, Morgenstern E, Moosbauer C, Eckly A, Spannagl M, Gachet C, Engelmann B.

Platelet ADP receptors contribute to the initiation of intravascular coagulation.
Blood 103:594-600 (2004)

Abkürzungsverzeichnis

abp280	- <i>actin binding protein 280</i>
AML	- akute myeloische Leukämie
AP-1	- Activatorprotein 1
APC	- aktiviertes Protein C
asTF	- <i>alternative spliced tissue factor</i>
BMS	- <i>bare metal stent</i>
CCD-Kamera	- <i>charge-coupled device-Kamera</i>
CCR3	- <i>chemokine (C-C motif) receptor 3</i>
cDNA	- Copy-Desoxyribonukleinsäure
CFT	- <i>clot formation time</i>
CFU	- <i>colony forming unit</i>
CHO-Cells	- <i>chinese hamster ovarial-cells</i>
CLC	- <i>Charcot-Leyden-Crystal protein</i>
CML	- chronisch myeloische Leukämie
COX	- Cyclooxygenase
CT	- <i>clotting time</i>
DES	- <i>drug eluting stent</i>
DIC	- <i>disseminated intravascular coagulation</i>
ECP	- <i>eosinophil cationic protein</i>
EDN	- <i>eosinophil-derived neurotoxine</i>
ELISA	- <i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
EM	- Elektronenmikroskop
EPO	- <i>eosinophil peroxidase</i>
erk	- <i>extracellular signal-protein related kinase</i>
FGFR1	- <i>fibroblast growth factor receptor 1</i>
FIP1-L1	- <i>pre-mRNA 3'-end-processing factor FIP1</i>
FSC	- <i>forward scatter</i>
GMCSF	- <i>granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor</i>
HAES	- Hydroxyethylstärke
Hb	- Hämoglobin
HEPES	- <i>2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure</i>
HES	- Hypereosinophiles Syndrom
HUVEC	- <i>human umbilical vein endothelial cell</i>
ICAM-1	- <i>inter-cellular adhesion molecule 1</i>
IgG	- Immunglobulin G
IL	- Interleukin
LFA-1	- <i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
(LT)C4	- Leukotrien T4
LPS	- Lipopolysaccharid
Mac-1	- <i>macrophage-1 antigen</i>
MACS	- <i>magnetic cell sorting</i>
MAPK	- <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MBP	- <i>major basic protein</i>
MCF	- <i>maximal clot firmness</i>
MDS	- myelodysplastisches Syndrom
MEK	- <i>MAPK or ERK kinase-Kinase</i>

MPS	- myeloproliferatives Syndrom
mRNA	- <i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NF- κ B	- <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NGF	- <i>nerve growth factor</i>
OPD	- O-Phenyldiamin
PAF	- <i>Platelet activation factor</i>
PAI-1	- Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
PAR	- Proteinase-aktivierter-Rezeptor
PBL	- <i>peripheral blood lymphocytes</i>
PBMC	- <i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	- <i>phosphate buffered saline</i>
PCI	- Protein C Inhibitor
PDGFRA	- <i>alpha-type platelet-derived growth factor receptor</i>
PDI	- <i>protein disulfide isomerase</i>
PFA-GA-Fixationslösung	- Paraformaldehyd-Glutaraldehyd-Fixationslösung
PKC	- Proteinkinase C
PMN	- <i>polymorphonuclear cells</i>
PP-Röhrchen	- Polypropylen-Röhrchen
PRP	- Plättchen-reiches Plasma
PS	- Phosphatidylserin
Rac1	- <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
raf	- <i>rapidly growing fibrosarcoma</i>
RANTES	- <i>"Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted"</i> = Chemokine (C-C motif) ligand 5
RNA	- Ribonukleinsäure
(RT-)PCR	- (Reverse Transkriptase-) Polymerase Kettenreaktion
S.E.M.	- <i>standard error of the mean</i>
SSC	- <i>sideward scatter</i>
TAFI	- <i>thrombin-activable fibrinolysis inhibitor</i>
TEG	- Thrombelastographie
TF	- <i>tissue factor</i>
TFPI	- <i>tissue factor pathway inhibitor</i>
TGF β 1	- <i>transforming growth factor β1</i>
TNF α	- Tumor-Nekrose-Faktor α
tPA	- <i>tissue-type</i> Plasminogen Aktivator
uPA	- <i>urokinase-type</i> Plasminogen Aktivator
VCAM-1	- <i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	- <i>vascular endothelial growth factor</i>
VLA-4	- <i>very late antigen 4</i>
wt	- Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Struktur der extrazellulären Domäne von TF	11
Abb. 2	Physiologische Gerinnungskaskade	14
Abb. 3	Granulozyten im peripheren Blut, HE-Färbung	19
Abb. 4	Eosinophile als multifunktionale Zellen	22
Abb. 5	Zellseparation mit MACS-Säulen	30
Abb. 6	Meßgrößen der Thrombelastographie	42
Abb. 7	Beispiel Transmigrationskammer	45
Abb. 8	Neutrophiler Metamyelozyt, EM, anti-TF-Färbung	50
Abb. 9	Basophiler Myelozyt, EM, anti-TF-Färbung	51
Abb. 10	Eosinophiler Myelozyt, EM, anti-TF-Färbung	52
Abb. 11	Reifer Neutrophiler im peripheren Blut, EM, anti-TF-Färbung	53
Abb. 12	Reifer Monozyt im peripheren Blut, unstimuliert, EM, anti-TF-Färbung	54
Abb. 13	Reifer Eosinophiler im peripheren Blut, unstimuliert, EM, anti-TF-Färbung	55
Abb. 14	Nachweis der Aktivierung von Eosinophilen durch ECP-Messung	57
Abb. 15	Expression von TF-mRNA in verschiedenen Zellen des peripheren Blutes, vor und nach Aktivierung	58
Abb. 16	Beispielhaftes Experiment der Flowzytometrie mit stimulierten Eosinophilen	60
Abb. 17	Präsentation von TF auf der Oberfläche von aktivierten Eosinophilen, Flowzytometrie	61
Abb. 18	Präsentation von TF auf der Oberfläche von aktivierten Eosinophilen, EM, anti-TF-Färbung	62
Abb. 19	Fehlender Aktivitätsnachweis von TF auf intakten Eosinophilen, Xa-Bildung	63
Abb. 20	Nachweis der prokoagulatorischen Aktivität des TF auf Eosinophilen nach Zell-Lyse, Xa-Bildung	64
Abb. 21	Akkumulation von Eosinophilen auf aktiviertem Endothel, Transmigrationskammer	66
Abb. 22	Frühe Transmigration (3-4 Min.) von Eosinophilen durch das Endothel, Transmigrationskammer	67
Abb. 23	Späte Transmigration (7 Min.) von Eosinophilen durch das Endothel, Transmigrationskammer	68
Abb.24	Hypothese zum Beitrag von Eosinophilen-TF zur Transmigration durch das Endothel	75

Tabellen

Tab. 1	Stimulation von Eosinophilen-Versuchsprotokoll	37
Tab. 2	Xa-Bildung mit aktivierten Eosinophilen - Versuchsprotokoll	39
Tab. 3	Thrombelastographie mit Eosinophilen, Neutrophilen und Plättchen - Versuchsprotokoll	43
Tab. 4	TF-Gehalt von isolierten Eosinophilen und Neutrophilen	56
Tab. 5	Anstieg des TF-Gehalts in Eosinophilen nach Stimulation	59

I. Tissue factor (TF) – Bedeutung in der Blutgerinnung und darüber hinaus

1. Gerinnungsforschung in den letzten 2000 Jahren

„Nach dem Schlachten des Opfertieres bleibt das Blut, solange es warm ist, flüssig; wenn es aber abkühlt, verfestigt es sich, weil die enthaltenen Fasern kalt und leimartig sind“ – so wird die Blutgerinnung schon im „Corpus Hippocraticum“ beschrieben, einer Sammlung medizinischer Texte, die im Zeitraum zwischen dem 4. Jh.v.Chr. bis zum 1. Jh.n.Chr. entstanden sind und zum Teil dem großen Arzt Hippokrates von Kos (460-370 v.Chr.) zugeschrieben werden. Auch Aristoteles (384-322 v.Chr.) bemerkt: „Das Blut der meisten Tiere enthält einen erdigen, festen Faserstoff, der die Gerinnung bewirkt, entfernt man jedoch diese Fasern, bleibt sie aus.“ [De partibus animalium].

So wurde schon lange vor unserer Zeitrechnung ein im Blut enthaltener Faserstoff - das Fibrin - und sein Zusammenhang mit der Blutgerinnung beschrieben. Allerdings wurde damals die Verfestigung des Blutes auf Abkühlung zurückgeführt – ähnlich dem Gefrieren von Wasser zu Eis. Erst 1832 gelang es Johannes Müller (1801-1894), diesen Faserstoff im Plasma zu lokalisieren: In filtriertem Froschblut konnte er das Vorhandensein von gelöstem Fibrin zeigen [Müller J, 1832]. Dies widerlegte die rein zelluläre Gerinnungstheorie nach der die Faserstoffe durch Zerstörung von Blutkörperchen frei wurden. Müller stellte die These auf, dass gelöstes Fibrin beim Austritt aus den Blutgefäßen in die ungelöste Form übergeht. Zur Ursache für die Umwandlung des gelösten in unlösliches Fibrin wurden im Lauf der Zeit verschiedene Theorien aufgestellt: atmosphärische Luft, Verlust von Kohlendioxid, Oxidationsvorgänge oder Kontakt mit Sauerstoff.

Der Physiologe Alexander Schmidt (1831-1894) postulierte 1876 eine fibrinoplastische und eine fibrinogene Substanz, die sich aufgrund von Fermentationsprozessen zu löslichem Fibrin verbinden. Das hypothetische Ferment, das diese Umwandlung bewirkten sollte, nannte er Thrombin. In Anwesenheit von Kalksalzen sollte das unlösliche Fibrin durch Salzfällung entstehen [Schmidt A, 1876]. Dass die Bildung von unlöslichem Fibrin auch ohne Zugabe von Calcium möglich ist, zeigte der Schwede Olof Hammarsten (1841-1932): Nach Zugabe von aktivem Thrombin zu Fibrinogen entstand unlösliches Fibrin [Hammarsten O, 1896]. Dies bedeutete, dass Kalksalze nicht für die Bildung des Fibrins, sondern für die Bildung des Fibrinferments – des Thrombins – notwendig sind.

Paul Oskar Morawitz (1879-1936) fasste 1905 die damals vorliegenden Forschungsergebnisse zu seiner zweiphasigen Gerinnungstheorie zusammen:

1. Prothrombin $\xrightarrow{+ \text{Thrombokinase} + \text{Calcium}}$ Thrombin
2. Fibrinogen $\xrightarrow{\text{Thrombin}}$ Fibrin

Somit waren für die Blutgerinnung vier Komponenten notwendig: Thrombokinase, Calcium, Prothrombin und Fibrinogen [Morawitz, 1905].

Es zeigte sich, dass Extrakte aus verschiedenen Geweben die Gerinnung beschleunigten, was den Begriff des Gewebsthromboplastin prägte, der später als *tissue factor* (TF) bezeichnet wurde. Damit war die These, dass Blut beim Verlassen der Gefäße gerinnt, belegt: Durch Kontakt von Blut mit Gewebsthromboplastin wird die Gerinnungskaskade initiiert, die schließlich zur Bildung von unlöslichem Fibrin führt.

Durch die Entdeckung der Thrombozyten und aufgrund der Versuche von Louis Le Sourd (1873-1941) und Philippe Pagniez (1875-1937), die mit plättchenreichem und plättchenarmem Plasma zeigten, dass die Thrombozyten thromboplastische Substanzen enthielten, wurde der Grundstein für die bis heute gültige Gerinnungstheorie gelegt. Sie beinhaltet eine enge Verknüpfung von zellulären und plasmatischen Faktoren.

Im Verlauf des 20. Jahrhunderts wurde diese Theorie durch die Fibrinolyse sowie durch die Entdeckung zahlreicher Aktivatoren und Inhibitoren und das bekannte Gerinnungsschema erweitert.

Gegenwärtig wird angenommen, dass TF das zentrale Starterprotein der physiologischen Gerinnung darstellt. TF initiiert durch Komplexbildung mit Faktor VII die Bildung des bereits bei Morawitz beschriebenen Prothrombinasekomplexes (Faktor Xa, Faktor Va, Calcium und Phospholipide) und die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin.

2. Vom Gen zum Protein

Das 12.4 kb lange TF-Gen ist auf Chromosom 1 p21-p22 [Kao, 1988] lokalisiert und umfasst sechs Exons, die durch fünf Introns voneinander getrennt sind, wobei Exon 2-5 für die extrazelluläre Domäne kodieren und Exon 6 sowohl die transmembranäre als auch die zytoplasmatische Domäne des TF-Proteins beinhaltet. Exon 1 beinhaltet Informationen über die Initiation der Translation, das posttranslationale Processing und das Einschleusen des Proteins in die Zellmembran [Edgington, 1991].

Nach dem Splicing des Primärtranskriptes entsteht in der Regel eine 2.3 kb lange mRNA [Scarpati, 1987]; allerdings kann durch alternatives Splicing auch mRNA einer Größe von 3.1 kb bis 3,4 kb gebildet werden, die aber für ein inaktives Protein kodiert [Brand, 1991].

In Zellen der Gefäßwand wie Fibroblasten und glatten Muskelzellen wird TF konstitutiv exprimiert [Drake, 1989]. Dagegen kann das TF-Gen in anderen Zellen des Gefäßsystems wie Monozyten und Endothelzellen durch geeignete Stimuli (z.B. LPS oder TNF- α) induziert werden, indem Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1 oder NF- κ B an verschiedene Promoterregionen binden [Mackman, 1997; Oeth, 1997].

Das TF-Gen wird in eine 295 Aminosäuren lange Polypeptidkette translatiert, wobei sich am N-terminalen Ende eine Signalsequenz von 32 Aminosäuren befindet, die für die Translokation des Proteins in die Zellmembran verantwortlich ist und im reifen Protein nicht mehr vorhanden ist. Das reife TF-Protein liegt in glykosyliertem Zustand vor und hat eine Größe von 47 kD. Es ist 263 Aminosäuren lang und besteht aus einer hydrophilen extrazellulären Domäne von 219 Aminosäuren, einer 23 Aminosäuren langen hydrophoben Transmembrandomäne und einem 21 Aminosäuren kurzen zytoplasmatischen Rest [Morrissey, 1987]. Aufgrund der strukturellen Homologie zum Interferon γ -Rezeptor wird TF als Klasse-II-Zytokin-Rezeptor klassifiziert [Edgington, 1991].

Die extrazelluläre Domäne besteht aus zwei Modulen (fibronectin-like domain type III) mit β -Faltblattstruktur, die einen Winkel von 120° einschließen (Abb. 1) und enthält zwei Disulfidbrücken [Ruf, 1994]. Faktor VIIa alleine ist eine sehr schwache Protease, erst die Bindung an TF führt durch eine allosterische Aktivierung zu ausgeprägter katalytischer Aktivität [Broze, 1980]. Die Verankerung des Proteins in der Zellmembran erfolgt durch die hydrophobe Transmembrandomäne, was den TF/VIIa Komplex in die Nähe von Phospholipiden (v.a. Phosphatidylserin) bringt und somit ein enger Kontakt von allen für die Hydrolyse von Faktor X zu Faktor Xa notwendigen Komponenten entsteht [Paborsky, 1991]. Phospholipide und Calcium sind wichtige Kofaktoren der Reaktion. Die intrazelluläre

Domäne besitzt zwei Phosphorylierungsstellen und scheint v.a. regulatorische Funktion zu haben, z.B. bei TF-Integrin-vermittelter Zellmigration [Versteeg, 2006] oder Angiogenese [Belting, 2004].

Die zytoplasmatische Domäne besitzt zwei potentielle Phosphorylierungsstellen: Serin 253, wo die Proteinkinase C angreifen könnte, und Serin 258 [Versteeg, 2006].

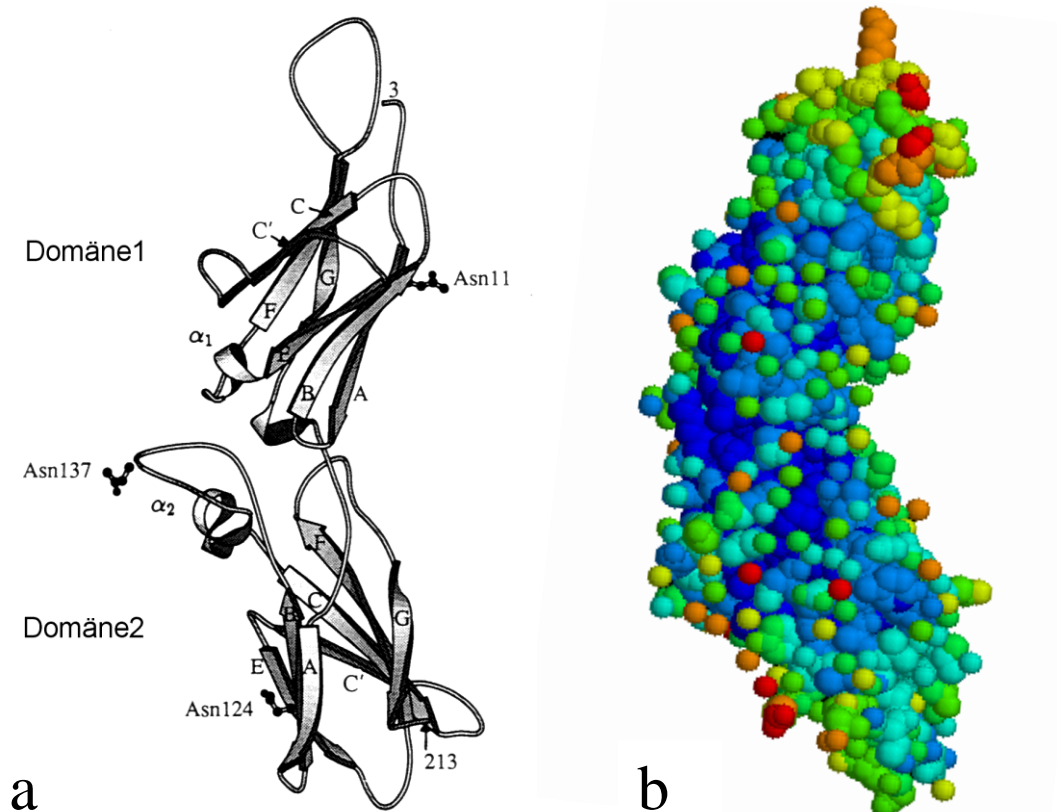


Abb. 1: Extrazelluläre Domäne von TF

- a) Schematische Darstellung der Anteile der extrazellulären Domäne des TF-Proteins. Die gesamte extrazelluläre Domäne ist 219 Aminosäuren groß und in α -helikalen bzw. β -Faltblatt Strukturen angeordnet, welche mit A-G gekennzeichnet sind. Die beiden Domänen bilden einen Winkel von 120° . Glykosylierungsstellen sind bei drei Asparagin-Seitenketten (Asn11, 124 und 137) hervorgehoben [Harlos et al., 1994].
- b) Rechts eine Darstellung der extrazellulären Domäne von TF im Molekül-Modell [http://en.wikipedia.org/wiki/Tissue_factor]

3. TF und Embryogenese

Untersuchungen mit TF-defizienten-Mäusen haben gezeigt, dass das Fehlen von TF nicht mit einer normalen Embryonalentwicklung vereinbar ist [Carmeliet, 1996; Bugge, 1996]. 90 % der Embryonen sterben in der Mitte der Schwangerschaft aufgrund von Veränderungen der

Dottersackgefäße und Wachstumsretardierung ab [Toomey, 1996]. Als Ursache der fehlerhaften Gefäße werden sowohl gerinnungsabhängige als auch gerinnungsunabhängige Mechanismen diskutiert. Einerseits kann es aufgrund der fehlenden TF-Aktivität zu ausgeprägten Blutungen kommen, andererseits fehlt TF auch in der Signaltransduktion. Dabei scheint sowohl die Thrombinbildung durch TF, als auch ein direkter TF/VIIa/Xa-abhängiger Signalweg eine Rolle zu spielen [Mackman, 2004]. Der genaue Mechanismus der Gefäßveränderungen im Dottersack von TF-defizienten-Mäusen ist noch nicht vollständig geklärt.

4. Verteilung von TF im Gewebe

Die Expression von TF unterscheidet sich deutlich zwischen den verschiedenen Gewebearten: In Gehirn, Lunge, Nieren, Plazenta, Uterus, Testis, Herz und Haut findet sich hohe TF-Expression, während Leber, Milz, Skelettmuskel und Thymus weniger TF enthalten [Drake, 1989]. Genauere immunologische Untersuchungen der Gewebe gaben Aufschluss über die TF-haltigen Zellarten: So konnten Fibroblasten der Adventitia, Astrozyten im Gehirn [Eddleston, 1993], Kardiomyozyten [Luther, 2000], bronchioläre und alveoläre Epithelzellen in der Lunge und Bindegewebe in der Plazenta [Faulk, 1990] als Träger des TF identifiziert werden.

Die Lokalisation von TF in Grenzflächen wie dem perivaskulären Gewebe, der Glia im Gehirn, Organkapseln, Plazenta und Haut sprechen für die Theorie des *hemostatic envelope*, also einer gerinnungsfördernden Ummantelung blutungskritischer Organe [Drake, 1989]. Dadurch kann die Integrität des Gefäßsystems erhalten und der Organismus vor größeren Blutverlusten oder deren Folgen für das umliegende Gewebe geschützt werden.

Seit einiger Zeit ist auch das Vorkommen von TF innerhalb des Gefäßsystems beschrieben worden. So kommt es durch Aktivierung mit LPS in Monozyten zur TF-Neusynthese [Osterud, 1998], was in vivo der Situation bei gramnegativer Sepsis nahe kommt.

Auch unter physiologischen Bedingungen konnte intravaskulärer TF nachgewiesen werden: In Thrombozyten wurde TF detektiert [Zillmann, 2001] und in den α -Granula und dem offenen kanalikulären System lokalisiert. Außerdem fanden sich im Plasma TF-positive Mikropartikel, die prokoagulatorisch wirksam sind [Müller I, 2003].

In Mikropartikel-freiem Plasma konnte durch immunologische Methoden löslicher TF nachgewiesen werden. Löslicher TF stellt eine alternative Splicingform von TF dar (asTF). Er besteht aus einem Großteil der extrazellulären Domäne von TF, die mit einer speziellen Peptidsequenz endet, so dass die Transmembrandomäne fehlt [Bogdanov, 2003].

5. TF als Starterprotein der Gerinnung

Nach heutigem Verständnis besteht der Prozess der Blutgerinnung aus einer Start- oder Initiationsphase sowie einer Augmentationsphase. Die Startphase wird dadurch induziert, dass Gerinnungsfaktoren des Blutes in die verletzte Gefäßwand gelangen (Media und Adventitia). Dadurch kann Faktor VII aus dem Plasma an den TF der Gefäßwand binden und wird durch allosterische Umwandlung aktiviert. Der entstandene TF/VIIa Komplex aktiviert Faktor X zu Faktor Xa. Zusammen mit Faktor Va, Ca^{2+} und anionischen Phospholipiden (wie Phosphatidylserin) bildet Faktor Xa den sog. Prothrombinasekomplex, der Prothrombin in aktives Thrombin umwandelt.

Das dabei zunächst in geringen Mengen entstandene Thrombin steigert während der Verstärkungsphase durch positive Rückkopplungsmechanismen seine eigene Synthese: Die Aktivierung von Faktor V zu Va, von Faktor VIII zu VIIIa und von Faktor XI zu XIa. Faktor XIa führt ebenso wie TF/VIIa zu einer Aktivierung von Faktor IX zu IXa. Parallel hierzu aktiviert Thrombin auch direkt Plättchen, wodurch es zu deren Formveränderung (*shape change*) und Aggregation kommt. Gleichzeitig findet eine Exposition von anionischen Phospholipiden auf der Außenseite der Plättchenmembran statt. Die mittels Thrombin entstandenen Faktoren VIIIa und IXa führen wie der TF/VIIa-Komplex zur Bildung von Xa, wodurch zusammen mit Faktor Va und den durch die Plättchenaktivierung vermehrt vorhandenen negativ geladenen Phospholipiden eine verstärkte Bildung des Prothrombinasekomplexes induziert wird. Das dadurch massiv entstandene Thrombin spaltet nun Fibrinogen zu Fibrin und Faktor XIII zu XIIIa, was schließlich zur Bildung eines unlöslichen Fibringerinnsels führt (Abb. 2).

Auch kommt es durch den Kontakt von Thrombozyten mit dem Kollagen der Gefäßwand zur raschen Präsentation von intravaskulärem TF auf den Plättchen, der durch Konjugation mit Leukozyten aktiviert wird. Dadurch wird die Gerinnungskaskade auch im wachsenden Thrombus in Gang gesetzt und bleibt nicht auf die Gefäßwand begrenzt [Engelmann, 2003].

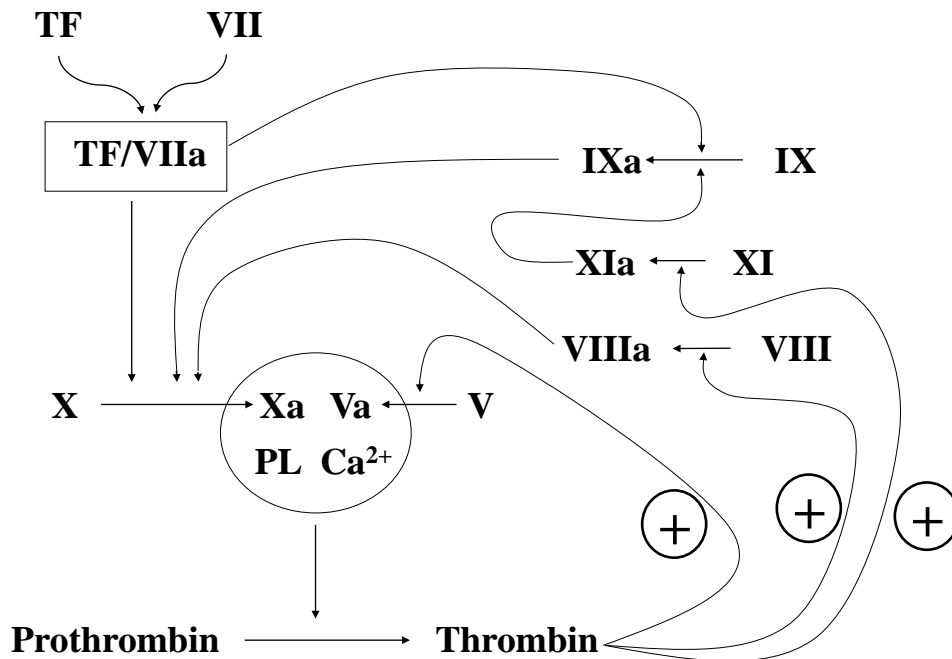


Abb. 2: Physiologische Gerinnungskaskade
 Initial führt der Komplex aus TF und Faktor VIIa zur Bildung von Faktor Xa, welcher im Komplex mit Phospholipiden, Faktor Va und Calcium Prothrombin zu Thrombin spaltet. Über positive Rückkopplungsmechanismen (+) kommt es in der Verstärkungsphase zu einer relevanten Thrombinbildung.

Hämostase

Die beschriebenen Gerinnungsvorgänge sind unter physiologischen Bedingungen streng reguliert, um eine überschüssige Gerinnung zu verhindern. Dabei bestehen Hemmungsmechanismen auf verschiedenen Ebenen der Gerinnungskaskade. Unter anderem wird der TF-VIIa-Xa-Komplex direkt durch *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) inhibiert. Gebildetes Thrombin wird durch Antithrombin inaktiviert, dessen Funktion durch Bindung an Heparin vervielfacht wird. Weiterhin kann Thrombin von einem pro- zu einem antikoagulatorischen Protein werden: Durch die Bindung von Thrombin an Antithrombin wird die Fibrinogenspaltung verhindert und gleichzeitig erfolgt eine Aktivierung von Protein C (APC). APC wirkt zusammen mit Protein S durch proteolytische Inaktivierung von Faktor V und Faktor VIII antikoagulatorisch.

Daneben wird das gebildete Fibrin durch komplexe Fibrinolyseprozesse abgebaut. Hauptakteur bei der Fibrinolyse ist Plasmin, das über Spaltung von Plasminogen durch

Plasminogen-Aktivatoren (*urokinase-type* uPA, *tissue-type* tPA) entsteht. Plasmin kann Fibrin zu verschiedenen Fibrin-Spaltprodukten abbauen. Die Aktivierung von Plasmin wird wiederum durch *plasminogen activator inhibitor* (PAI-1) gehemmt, wodurch ein prokoagulatorischer Effekt initiiert wird. Auch durch Thrombin-aktivierbaren Fibrinolyse-Inhibitor (TAFI) und Protein C-Inhibitor (PCI) wird die Fibrinolyse unterdrückt [Chambers, 2008].

6. TF-Encryption

Die prokoagulatorische Funktion von TF ist in Zellen des peripheren Blutes im Ruhezustand oft nicht oder nur geringfügig nachweisbar. In der Literatur wird von einer *encryption* des TF gesprochen. Diese scheint einerseits auf einer Dimer-Bildung des TF-Proteins zu beruhen [Bach, 2006], andererseits vom Redoxzustand eines Cysteinopaars (Cys186-Cys209) abhängig zu sein [Ahamed, 2006]. Dieser Redoxzustand der Disulfid-Brücke wird von der *protein disulfide isomerase* (PDI) gesteuert [Manyukan, 2008]. Faktor VII und Faktor VIIa können sowohl an die kryptische Form als auch an die koagulatorisch aktive Form von TF binden.

7. TF – gerinnungsunabhängige Funktionen

Unabhängig von der wohletablierten Theorie des TF als Starterprotein der Gerinnung konnten in den letzten Jahren weitere – gerinnungsunabhängige – Funktionen von TF entdeckt werden.

a. TF-abhängige Signaltransduktion

TF gehört zur Klasse der Gruppe-II-Zytokinrezeptoren, was eine Rolle in der Signaltransduktion der Zelle nahe legt. Tatsächlich wird eine Vielfalt an zellulären Prozessen von TF-VIIa-abhängigen Signalwegen reguliert, wie z.B. Gen-Transkription und Translation, Apoptose und Zellmigration [Camerer, 1999; Versteeg, 2002; Sørensen, 2003].

Die Signaltransduktion erfordert die Bindung an Faktor VIIa, wird durch *encryption* jedoch kaum beeinträchtigt [Ahamed, 2006]. Die TF-abhängige Signaltransduktion führt über sogenannte Protease aktivierte Rezeptoren (PAR). Dabei handelt es sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen, die durch proteolytische Spaltung

des extrazellulären N-Terminus aktiviert werden [Riewald, 2002]. Die Beteiligung von PAR2 bei der TF/VIIa-abhängigen Signaltransduktion wurde zuerst in Oozyten gezeigt, die nur durch die zusätzliche Expression von PAR2 auf TF/VIIa reagierten [Camerer, 2000]. Durch Versuche mit Antikörpern gegen die verschiedenen PAR-Unterformen (1-4) zeigte sich, dass vor allem PAR2 mit TF-VIIa interagiert [Hjortoe, 2004]. Zusätzlich kann Faktor Xa, der im *ternary complex* eng mit TF-VIIa verbunden ist, über PAR1 und PAR2 an der Signaltransduktion teilnehmen [Belting, 2005]. *Downstream* von PAR2 können verschiedene Signalwege aktiviert werden [Versteeg, 2006]. Insgesamt führt die Aktivierung von PAR durch Beeinflussung zahlreicher Zelltypen und Bildung von Entzündungsmediatoren zu einer proinflammatorischen Antwort [Bunnett, 2006]. Thrombin, das bei der Gerinnung gebildet wird, aktiviert in geringer Menge PAR1, in größeren Mengen auch PAR3 und PAR4 und führt somit zu einer indirekten TF-induzierten Signaltransduktion. Dabei kommt der zytoplasmatischen Domäne von TF eine wichtige Bedeutung zu. Durch Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von TF (z.B. durch PAR2) kommt es zur Aktivierung von Gen-Expression, Zellproliferation, gesteigerter Motilität und auch zu einer Aktivierung von Integrinen [Versteeg, 2006].

b. TF und Zellmigration

Die Transmigration durch das Endothel, also die Auswanderung aus dem intravaskulären Raum läuft in mehreren Phasen ab. Zunächst erfolgt eine Kontaktaufnahme mit dem Endothel (*rolling*), im Verlauf kommt es zu einer festen Adhäsion (*adhesion*) und schließlich zum Durchtritt der Zelle durch das Endothel in den extravaskulären Raum (*transmigration*).

Die Transmigration von aktivierten Monozyten durch das Endothel wird durch anti-TF-Antikörper signifikant gehemmt [Randolph, 1998]. Weiterhin zeigt sich eine Ko-Lokalisation von TF und Bestandteilen des Zytoskeletts wie Aktin und Aktin-bindende Proteine [Müller M, 1999]. Dabei konnte auch eine direkte Interaktion der zytoplasmatischen Domäne von TF mit einem Aktin-bindenden Protein (*abp280*) nachgewiesen werden [Ott, 1998].

TF könnte die Zellmigration über eine direkte Hemmung der Integrin-Dimere beeinflussen. Im unphosphorylierten Zustand hat die zytoplasmatische Domäne von TF eine inhibitorische Wirkung auf Integrin-Dimere, die durch die Phosphorylierung aufgehoben wird. Dies führt zu Veränderungen des Zytoskeletts steigert die Zellmigration [Dorfleutner, 2004].

Auch die PAR2-Aktivierung durch TF-VIIa *per se* hat einen promigratorischen Effekt. Über Aktivierung von Proteinkinase C kommt es zur Phosphorylierung des C-Terminus von PAR2. Die Phosphorylierung führt u.a. zur Bindung von β -Arrestin und zur Assoziierung mit *clathrin-coated pits*. Dieser Komplex tritt mit dem F-Aktin-System in Kontakt, es kommt zur Gruppierung von Aktin und damit zur Zellmigration [Ge, 2003].

c. Metastasierung, Tumorwachstum und Angiogenese

Tumorzellen zahlreicher Zellreihen exprimieren TF und das maligne Potential dieser Zellen korreliert mit der Höhe der TF-Expression [Milsom, 2008]. Dabei besteht die Malignität in einem raschen Tumorwachstum und der Fähigkeit zur Metastasierung, wobei einerseits die Fähigkeit zur Migration, andererseits auch eine für den wachsenden Tumor ausreichende Blutversorgung durch Angiogenese entscheidend ist.

Durch direkte Hemmung von Integrin-Heterodimeren und die regulatorische Funktion der zytoplasmatischen Domäne von TF wird die Zellmigration auch in Tumorzellen beeinflusst. Dabei ist jedoch die Bindung von Faktor VIIa an TF erforderlich, was am ehesten zu einer allosterischen Veränderung führt [Müller BM, 1998]. Hier spielt wieder die Signaltransduktion über PAR2 eine bedeutende Rolle: Das Tumorwachstum in Brustkrebs-Zellreihen konnte durch Hemmung dieses Signalweges mit spezifisch die Signaltransduktion blockierenden Antikörpern signifikant reduziert werden. Dabei hatten Antikörper, die die Protease-Aktivität des TF-VIIa-Komplexes spezifisch hemmten, keinen wesentlichen Effekt auf das Tumorwachstum [Versteeg, 2008a]. PAR1-Defizienz zeigte in einem Maus-Modell im Gegensatz zur PAR2-Defizienz keine wesentliche Verzögerung bei der Entwicklung eines invasiven Mammakarzinoms [Versteeg, 2008b], was auf einen proangiogenetischen Effekt von PAR2 hindeutet. Bei Mäusen mit fehlender zytoplasmatischer Domäne des TF zeigte sich ein deutlicher Anstieg des Tumorwachstums [Belting, 2004]. Also kommt der zytoplasmatischen Domäne eine wachstumshemmende Funktion zu, am ehesten über die Hemmung des proangiogenetischen Signals über PAR2. Es zeigte sich, dass diese regulatorische Funktion des TF durch die unphosphorylierte zytoplasmatische Domäne induziert wird. Im Einklang mit diesen Ergebnissen wurden bei neu diagnostizierten invasiven Mammakarzinomen im Vergleich zu Carcinomata *in situ* erhöhte Werte für TF, PAR2 und für phosphorylierten TF beobachtet [Ruf, 2010].

d. Entzündungsprozesse

Vor allem die frühe Aktivierung des Gerinnungssystems über TF-VIIa beeinflusst neben der Koagulation auch die Aktivierung von Entzündungsprozessen, die z.B. bei Sepsis zu Schock, Organversagen und Tod führen können. In Untersuchungen an einem Sepsismodell bei Pavianen konnte gezeigt werden, dass eine gezielte Blockade von Faktor Xa zwar zu einer Abnahme der disseminierten intravaskulären Gerinnung (DIC) führt, jedoch keinen nennenswerten Einfluß auf die Entzündungsreaktion oder die Mortalität hat [Taylor, 1991b]. Im Gegensatz dazu konnte im gleichen Modell durch spezifische Blockade von TF-VIIa nicht nur die DIC, sondern auch die Entzündungsreaktion unterdrückt und damit auch das Überleben deutlich verbessert werden [Taylor, 1991a]. Dies weist auf einen direkten proinflammatorischen Einfluß des TF-VIIa-Komplexes hin. Dafür spricht auch, dass die Blockade von TF-VIIa zu einer Reduktion der Plasmaspiegel von Entzündungsmediatoren wie IL-6 oder IL-8 führt [Taylor, 1998]. Es gibt Hinweise dafür, dass diese Effekte über PAR-Rezeptoren vermittelt werden, wobei nur durch Suppression von PAR1 und PAR2 eine ähnliche Hemmung der IL-6-Freisetzung erreicht werden konnte wie in *low-TF* Mäusen [Pawlinksi, 2004]. PAR1 wird schon durch geringe Mengen an Thrombin aktiviert, PAR2 über den TF-VIIa-Komplex. Weitere Untersuchungen an PAR-defizienten Mäusen führten jedoch zu keiner Reduktion der Entzündungsreaktion oder Reduktion der Mortalität [Camerer, 2006], so dass auch alternative Signalwege – wie z.B. über *Toll-like receptors* – diskutiert werden müssen. Trotz der ermutigenden Ergebnisse im Tiermodell konnte in einer Phase3-Studie mit einer Blockade von TF-VIIa durch rekombinanten TFPI kein positiver Effekt auf die Mortalität der Patienten festgestellt werden [Abraham, 2003].

II. Charakterisierung eosinophiler Granulozyten

TF kommt nicht nur extravaskulär, sondern auch innerhalb des Gefäßsystems vor. Plättchen spielen dabei eine Rolle, aber auch in Monozyten kann nach entsprechender Stimulation TF nachgewiesen werden. In einer anderen Leukozytenpopulation – den neutrophilen Granulozyten – wird das Vorhandensein von TF kontrovers diskutiert. In dieser Arbeit soll nun besonderes Augenmerk auf einen weiteren Subtyp von Leukozyten gerichtet werden: Eosinophile Granulozyten.

1. Morphologie

Der Begriff „eosinophiler Granulozyt“ wurde 1879 von Paul Ehrlich eingeführt, als dieser im Mikroskop eine Zellpopulation mit bemerkenswerter Affinität zu sauren Farbstoffen wie Eosin entdeckte. Der reife Eosinophile hat einen Durchmesser von ca. 8-10 µm und besitzt einen brillenförmigen, in der Regel bilobulär segmentierten Kern (Abb. 3).

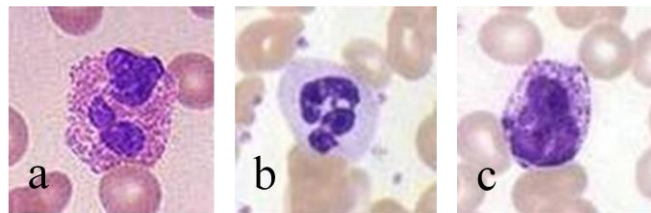


Abb. 3: a) Eosinophiler Granulozyt, HE-Färbung
Deutlich erkennbar sind die rot gefärbten eosinophilen Granula, sowie der bilobulierte Kern.
b) Neutrophiler Granulozyt, HE-Färbung
c) Basophiler Granulozyt, HE-Färbung

Eosinophile zeichnen sich durch ihre zahlreichen intrazellulären Granula aus. Charakteristisch für Eosinophile sind die „spezifischen“ **Granula**, die sich durch einen kristalloiden Kern, der aus MBP (*major basic protein*) besteht, auszeichnen. In der umgebenden Matrix finden sich andere basische Proteine, unter anderem auch ECP (*eosinophil cationic protein*), EPO (*eosinophil peroxidase*) und EDN/EPX (*eosinophil-derived neurotoxin*). Diese stark basischen Proteine sind ursächlich für die leuchtend orange-rote Färbung der Eosinophilen im Ausstrich nach Papanheim.

Weiterhin unterscheidet man **Primärgranula**, die u.a. wohl als Vorläufer der spezifischen (Sekundär-) Granula zu sehen sind [Egesten, 2001] und **small-type Granula**, deren Anzahl nach Zellaktivierung zunimmt. Möglicherweise entwickeln sich *small-type* Granula aus den spezifischen Granula [Parmley, 1974].

Die **sekretorischen Vesikel** enthalten Albumin, was auf einen endozytotischen Ursprung hinweist und auch membrangebundene Rezeptoren (z.B. CCR3) [Egesten, 2001].

Lipidkörperchen sind durch die Enzyme COX (Cyclooxygenase), 5-Lipoxygenase und das Substrat Arachidonsäure an der Synthese von Lipidmediatoren wie PAF oder Leukotrien (LT)C₄ beteiligt [Giembycz, 1999].

2. Vorkommen

Eosinophile Granulozyten machen ca. 2-4 % aller Leukozyten im peripheren Blut aus, also 100-350/nl absolut. Erhöhte Werte findet man bei Patienten mit Allergien oder parasitären Erkrankungen; in diesem Fall scheinen die Zellen oft hypodens und vakuolisiert mit kleineren Granula. Die Halbwertszeit im Blut beträgt ca. 8 Stunden. Im Gewebe steigt die Lebensdauer der Eosinophilen auf bis zu zwei Wochen an [Rothenberg, 1987]. Für die Verlängerung der Lebenszeit von Eosinophilen im Gewebe ist IL-5 essentiell, ohne diesen Faktor tritt eine spontane Apoptose auf [Simon, 1997]. Beim Gesunden befindet sich ein Großteil der Eosinophilen im Gastrointestinaltrakt, normalerweise in der Lamina propria aller Segmente, ausgenommen des Ösophagus [Mishra, 1999]. Weiterhin können sie im Thymus, der Brustdrüse und dem Uterus nachgewiesen werden [Rothenberg 2006].

Im Rahmen einer Entzündungsreaktion werden Eosinophile auf verschiedene chemotaktische Reize hin (z.B. Eotaxin) aus der Blutbahn an den Entzündungsherd rekrutiert. Hier können sie durch verschiedene Mechanismen in die Immunreaktion mit eingreifen.

Migration

Da eosinophile Granulozyten sich nur vorübergehend im peripheren Blut aufhalten und an entzündliche Foci rekrutiert werden, kommt ihrer Migration eine zentrale Bedeutung zu. Unter physiologischen Bedingungen wird die Verteilung von Eosinophilen in Gastrointestinaltrakt, Thymus, Brustdrüse und Uterus hauptsächlich durch die konstitutive Expression von Eotaxin1 reguliert [Matthews, 1998]. Bei Eotaxin1-defizienten Mäusen zeigt sich eine deutlich reduzierte Eosinophilen-Population in diesen Geweben [Humbles, 2002].

Im Rahmen einer (allergischen) Entzündungsreaktion stellen sich von den zahlreichen bei der Leukozytenrekrutierung beteiligten Mediatoren IL-5 und die Eotaxine 1-3 als spezifisch für die Eosinophilen-Migration dar [Rankin, 2000; Mishra, 2002]. Aber auch eine Vielzahl an anderen Zytokinen (z.B. von Th2-Zellen gebildetes IL-4, IL-13) und Chemokinen (z.B. RANTES) tragen zur zielgerichteten Migration von Eosinophilen bei. Eotaxine werden im Rahmen einer Entzündung von Gewebszellen (z.B. Zellen des respiratorischen Epithels, Fibroblasten) oder durch von Allergenen induzierten infiltrativen Zellen wie Makrophagen oder den Eosinophilen selbst gebildet [Hogan, 2008].

Die Funktion der Eotaxine 1-3 nach Allergen-Exposition im zeitlichen Ablauf: Eotaxin1 steuert die frühe Eosinophilen-Rekrutierung, Eotaxin2 die mittlere Phase nach 24h und Eotaxin3 die Spätphase [Zimmermann, 2003].

3. Entwicklung

Im Knochenmark entstehen durch die Wirkung verschiedener Wachstumsfaktoren einer pluripotenten myeloischen Stammzelle sogenannte *colony-forming-units* (CFU), d.h. Stammzellen, die bereits in eine bestimmte Richtung (z.B. CFU-Eosinophile, CFU-Basophile) determiniert sind. Eine Ausnahme bildet hier auf dieser Stufe der Entwicklung die bipotente CFU-Granulozyten/Makrophagen, aus der die beiden genannten Zellreihen hervorgehen [Benninghoff Band I/606]. In den drei granulozytären Reihen erfolgt die Entwicklung von Myeloblasten über Promyelozyten (schon hier kann zwischen neutrophilen, basophilen und eosinophilen Granula unterschieden werden), den Myelozyten und den Metamyelozyten bis hin zum reifen Granulozyten.

Bei der Entwicklung von Eosinophilen aus einer pluripotenten Stammzelle spielen vor allem drei Zytokine eine Rolle: IL-3, IL-5 und GM-CSF.

4. Funktion

Eosinophile sind multifunktionale Leukozyten, die an zahlreichen Entzündungsprozessen beteiligt sind, wie Infektionen durch Parasiten, Viren oder Bakterien, Verletzungen, Immunabwehr bei Tumorerkrankungen und bei allergischen Erkrankungen (Abb. 4). Sie exprimieren eine Vielzahl an Oberflächenproteinen, Zytokinen, Chemokinen, Lipidmediatoren und zytotoxischen Substanzen [vgl. Überblicksarbeit Hogan, 2008].

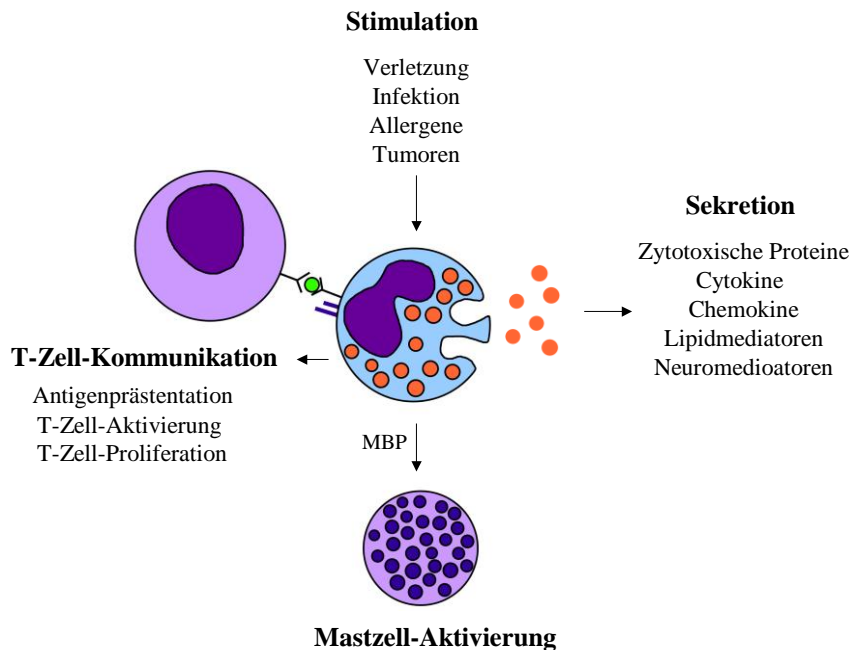


Abb. 4: Eosinophile als multifunktionale Zellen
Nach Stimulation der Eosinophilen durch bestimmte Reize kommt es zur Sekretion von Mediatoren, Aktivierung von Mastzellen und zur Kommunikation mit T-Zellen, woraus eine komplexe Immunantwort resultiert.
[nach Rothenberg, 2006]

a. Zytotoxische Proteine in den spezifischen Granula

Eine der Besonderheiten der eosinophilen Granulozyten ist die Expression der stark zytotoxischen Proteine MBP, ECP, EDN und EPO, die in den spezifischen Granula gespeichert sind und bei Degranulation an das umliegende Gewebe abgegeben werden. ECP und EDN besitzen neben der Zytotoxizität eine Ribonukleaseaktivität, EDN auch noch eine neurotoxische Wirkung. MBP wirkt zusätzlich zu zytotoxischen Effekten proinflammatorisch durch Aktivierung von Complement, Aktivierung von Plättchen/Mastzellen und eine

Erhöhung der Gefäßpermeabilität. Auch EPO wirkt zytotoxisch, weiterhin führt EPO zur Bildung von Peroxiden und wirkt mutagen auf DNA und RNA.

Darüber hinaus sind diese Proteine prokoagulatorisch wirksam. MBP, ECP und EPO inaktivieren Faktor XII durch die zahlreichen basischen Gruppen und verhindern dadurch möglicherweise eine Aktivierung der Fibrinolyse durch FXII-Spaltprodukte [Yarovaya, 2002]. ECP kann an Heparin binden und dadurch die Verstärkung der Funktion von Antithrombin unterdrücken [Fredens, 1991]. Weitere *in vitro*-Untersuchungen zeigten eine Bindung von Thrombomodulin an ECP, EPO und MBP, was eine Aktivierung von Protein C verhinderte [Slungaard, 1993]. Zusammengenommen deuten die Ergebnisse auf eine gerinnungssteigernde Funktion der sezernierten Proteine hin.

Außerdem scheinen MBP und ECP in der Lage zu sein, *per se* eine Aktivierung von Thrombozyten herbeizuführen [Rohrbach, 1990]

b. Antigen-Präsentation

Als Antigen-präsentierende Zellen sind Eosinophile in der Lage, über die direkte Kommunikation mit T-Zellen eine spezifische Immunantwort anzustoßen [Shi, 2004]. Dabei erfolgt durch Präsentation von Antigenen an CD4+-T-Zellen sowohl eine vermehrte Proliferation der T-Zellen [MacKenzie, 2001], als auch über verschiedene Zwischenprodukte eine Polarisation mit Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichtes in Richtung Th2 durch verstärkte Apoptose von Th1-Zellen [Odemuyiwa, 2004].

c. Mastzell-Aktivierung

Die Inkubation von ruhenden Mastzellen mit MBP, ECP oder EPO führt zu einer konzentrations-abhängigen Freisetzung von Histamin [Zheuthlin, 1984]. Dabei kommt es nicht nur zur Exozytose von Mastzell-Proteinen, sondern auch zur Zytokin-Produktion und zur Bildung von Eicosanoiden [Piliponksy, 2002]. Von Eosinophilen produzierter NGF (*nerve growth factor*) verlängert die Überlebenszeit von Mastzellen [Horigome, 1994].

d. Parasitäre Erkrankungen

Schon früh wurde in der Literatur der Zusammenhang zwischen Eosinophilie und parasitären Infektionen beschrieben. In der Tat wirken eosinophile Granulozyten *in vitro* zytotoxisch auf Parasiten [Butterworth, 1977]. Jedoch konnte dies *in vivo* zumindest im Maus-Modell bislang kaum bestätigt werden. So wurde z.B. nach Schistosoma-Infektion von Mäusen mit drastisch reduzierter Eosinophilenzahl keine Veränderung gegenüber dem Wildtyp beobachtet [Swartz, 2006]. Trotz jahrelanger Forschung gibt es immer noch keine befriedigenden Daten zum Beitrag von Eosinophilen bei der Abwehr von parasitischen Infektionen *in vivo*.

e. Asthma bronchiale

Erhöhte Eosinophilenzahlen in Gewebe, Blut und Knochenmark sind kennzeichnend für die meisten Asthma-Formen, weiterhin scheint die Höhe der Eosinophilenzahl mit dem Schweregrad der Krankheit zu korrelieren [Bousquet, 1990]. Daraus leitet man den Stellenwert des Eosinophilen als zentrale Effektorzelle beim Asthma bronchiale ab.

So kommt es möglicherweise zu einer direkten Schädigung des respiratorischen Epithels durch die in den eosinophilen Granula enthaltenen basischen Proteine (ECP, EDN, EPO und MBP), durch Lipidmediatoren wie Leukotriene (die eine Bronchuskonstriktion und Schleimproduktion bewirken können [Bandeira-Melo, 2002]) und durch Bildung von freien Radikalen. Dafür spricht, dass in der bronchoalveolären Lavage von Patienten mit allergischem Asthma erhöhte Konzentrationen von Eosinophilen-spezifischen zytotoxischen Proteinen wie z.B. MBP nachgewiesen werden konnten [Rothenberg, 1998]. MBP kann außerdem direkt die Kontraktion von glatten Muskelzellen induzieren [Jacoby, 1993].

Die genaue Funktion der Eosinophilen bei der Pathogenese des allergischen Asthmas wird jedoch noch kontrovers diskutiert. In einem Therapieversuch mit Antikörpern gegen IL-5 in Patienten mit allergischem Asthma sank zwar die Eosinophilenzahl in Blut und Sputum deutlich ab, jedoch zeigte sich bei den Patienten kein signifikanter klinischer Benefit in Bezug auf bronchiale Hyperreagibilität und Reaktion auf Antigene [Leckie, 2000]. Auch in Untersuchungen einer allergischen Hautreaktion nach Behandlung mit anti-IL-5-Antikörpern wurde kein Effekt der Eosinophilen auf das Ausmaß der Quaddelbildung beobachtet [Phipps, 2004]. Hier ist jedoch anzumerken, dass durch eine Vorbehandlung mit anti-IL5-Antikörpern die Bluteosinophilenzahl um 90%, die Zahl der Gewebseosinophilen sogar nur um 55%

reduziert werden konnte [Flood-Page, 2003a], so dass der fehlende Effekt in diesen Studien möglicherweise auf die noch intakte Funktion der Rest-Eosinophilen zurückzuführen ist. Bisher besteht in klinischen Studien keine Möglichkeit einer kompletten Eosinophilen-Depletion. Durch den Einsatz von CCR3-Antagonisten konnte kürzlich im Maus-Modell eine signifikante Reduktion der Blut- und Gewebseosinophilen erreicht werden [Wegmann, 2007]. Möglicherweise bietet dieses Verfahren in Kombination mit der Infusion von anti-IL-5-Antikörpern die Möglichkeit einer effizienten Eosinophilen-Depletion.

In einer klinischen Studie konnte trotz nur teilweiser Reduktion der Eosinophilenzahl durch Anti-IL-5-Antikörper eine signifikante Reduktion der in der Bronchialwand abgelagerten Matrixproteine gezeigt werden [Flood-Page, 2003b], was auf eine Beteiligung der Eosinophilen am *airway remodeling* hindeutet. In verschiedenen Tiermodellen mit wiederholter Allergen-Inhalation konnte der Zusammenhang zwischen Gewebs-Eosinophilie und dem *airway remodeling* nachgewiesen werden. Das *airway remodeling* zeichnet sich durch verschiedene Prozesse aus, u.a. durch die Proliferation von Fibroblasten, Aktivierung des Epithels, die vermehrte Produktion von Matrixproteinen und eine erhöhte Schleimbildung [Kay, 2004].

f. Hypereosinophiles Syndrom (HES)

Das hypereosinophile Syndrom wurde erstmalig 1968 bei Patienten beschrieben, die an Gewichtsverlust, Fieber, Nachtschweiß, kardiopulmonalen Symptomen, Hepatosplenomegalie und einer ausgeprägten Eosinophilie litten [Hardy, Anderson, 1968]. Zwei dieser Patienten starben, in der Autopsie stellten sich vergrößerte Herzen mit wandadhärenten Thromben dar. 1975 wurden diagnostische Kriterien für das HES aufgestellt:

1. Anhaltende Eosinophilie über $1,5 \times 10^9/l$ über mind. 6 Monate
2. Ausschluß bekannter Gründe für Eosinophilie (z.B. Parasiten)
3. Symptomatische Organbeteiligung

Das HES ist ein heterogenes Krankheitsbild aus dem leukoproliferativen Formenkreis und tritt häufiger bei Männern als bei Frauen (9:1) auf. Es treten zahlreiche Organmanifestationen auf, die in vielen Fällen mit thrombotischen Ereignissen verknüpft sind [Hogan, 2008]. Am häufigsten – und oft prognoselimitierend – ist eine kardiale Beteiligung mit Kardiomyopathie, ausgeprägten wandadhärenten Thromben (mit der Gefahr einer Embolisation) und schließlich

einer Endomyokardfibrose [Kleinfeld, 2010]. Neben einer Embolisation kommt auch eine lokale thrombotische Mikroangiopathie als Ursache der Organmanifestationen in Frage [z.B. Liapis, 2005].

2003 wurde eine Tyrosinkinase identifiziert, die ein Fusionsprotein aus FIP1-L1 und der zytoplasmatischen Domäne von *platelet-derived growth factor α* (PDGFRA) - Rezeptor darstellt [Cools, 2003]. Das FIP1-L1-PDGFRA-Fusionsgen führt im Maus-Modell zu einer IL-5 Überexpression und dadurch zu einer ausgeprägten Eosinophilie [Yamada, 2006].

Interessanterweise wird bei sehr unterschiedlichen Formen der Hypereosinophilie durchgängig eine erhöhte Thromboseneigung beobachtet [Ogbogu, 2007; Hussain, 1994; Ames, 2008; Marzano, 2010].

Fragestellung

Bislang wurde zwischen eosinophilen Granulozyten und TF kein Zusammenhang hergestellt. In der vorliegenden Arbeit sollen die folgenden Fragen beantwortet werden:

- 1) Enthalten eosinophile Granulozyten TF?
- 2) Wenn ja, ist TF präformiert vorhanden, oder entsteht TF durch Neusynthese nach Aktivierung der eosinophilen Granulozyten?
- 3) Wird TF in Eosinophilen durch Aktivierung auf der Oberfläche präsentiert?
- 4) Ist der TF in eosinophilen Granulozyten prokoagulatorisch aktiv und könnte daher zur Aktivierung des extrinsischen Gerinnungssystems beitragen?
- 5) Welche funktionelle Bedeutung könnte dem TF in eosinophilen Granulozyten zukommen?

III. Material/Methoden

1. Spender

Es wurden ausschließlich gesunde Spender in die Studie aufgenommen, deren Anteil von Eosinophilen an der Gesamt-Leukozytenzahl 2-4% betrug, entsprechend dem Normalwert bei nichtallergischen Personen. Um den Eosinophilen-Anteil zu bestimmen wurde jeweils ein maschinelles Differentialblutbild durchgeführt. Außerdem wurden schwere Allergien sowie die Einnahme von Medikamenten anamnestisch ausgeschlossen.

2. Blut- und Zellpräparation

a. Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte durch Venenpunktion in der Ellenbeuge mit sog. Butterfly-Nadeln nach vorangegangener Hautdesinfektion. Das Blut wurde in Kunststoff-Spritzen aufgezogen, in die zur Antikoagulation Na-Citrat-Lösung (1ml pro 10 ml Blut, Endkonz. 0,38%) vorgelegt war.

b. Eosinophilen-Isolation aus Vollblut

Durch den geringen Anteil der Eosinophilen im Blut wurden pro Versuch Zellen aus 120-200 ml Blut isoliert.

Da es keinen spezifischen Marker für eosinophile Granulozyten gibt, der zur Isolation verwendet werden könnte, wurde eine sogenannte Negativselektion durchgeführt.

Das antikoagulierte Vollblut wurde gleichmäßig auf 10 ml PP-Röhrchen verteilt und zunächst bei 180 x g 15 Min. zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde zum größten Teil entfernt. Der sog. Buffy-Coat, die Schicht zwischen Plasma und Erythrozytenpellet, in der sich die Blutleukozyten nach der Zentrifugation anreichern, wurde sorgfältig abgenommen und in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die folgenden Arbeitsschritte wurden für jedes Röhrchen separat durchgeführt:

Um die Erythrozytenzahl zu verringern wurde der Buffy-Coat mit 6% HAES Lösung (Hydroxyethylstärke) auf 15 ml aufgefüllt, durchmischt und dann bei 28 x g 10 Min. zentrifugiert. HAES bewirkt eine Geldrollenbildung der Erythrozyten; diese sind dann schwerer und setzen sich unten ab. Der Überstand und die obersten 2 mm des Pellets wurden

abgenommen, in ein anderes 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und die Zellen bei 180 x g für 10 Min. herunterzentrifugiert. Das Pellet wurde nach dem Verwerfen des Überstandes mit Calcium-freiem PBS in einem Gesamtvolumen von je 5 ml resuspendiert. Die so nochmals konzentrierten Leukozyten wurden dann zur Elimination der Mono- und Lymphozyten (PBMC) über einen Ficoll-Gradienten zentrifugiert. Dazu wurde die Zellsuspension vorsichtig in 15 ml Falcon-Röhrchen über 5 ml zimmerwarmes Ficoll (1,007 g/ml) geschichtet und der Gradient für 25 Min. bei 210 x g zentrifugiert. Beim Herausnehmen aus der Zentrifuge durften sich die verschiedenen Fraktionen nicht zu stark vermischen. Durch den Dichteunterschied zwischen PBMC und den restlichen Blutzellen trennten sich die PBMCs ab und der gesamte Überstand mitsamt den PBMCs konnte abgenommen und verworfen werden. Das verbleibende Pellet wurde nun auf Eis mit 5 ml H₂O_{dest} resuspendiert, die Lyse nach 60 s mit 5 ml 1,8 % NaCl – Lösung gestoppt, die Zellen bei 180 x g für 10 Min. herunterzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die resuspendierten Zellpellets wurden in ein einziges Falcon-Röhrchen gepoolt und die Lyse mitsamt der Zentrifugation wiederholt. Das nun erythrozytenfreie Pellet wurde in 50 µl Antikörperpuffer resuspendiert, mit 50 µl anti-CD16 Microbeads versetzt und für 30 Min. bei 4°C inkubiert. Um evtl. verbleibende Monozyten zu entfernen wurden nach 15 Min. Inkubation zusätzlich noch 35 µl anti-CD14 Microbeads zugesetzt.

In der Zwischenzeit wurden die magnetischen MACS-Trennsäulen in den dazugehörigen Magneten überführt und mit 2 ml Antikörper-Puffer vorgespült. Der Durchlauf wurde verworfen.

Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension mit 2 ml Antikörper-Puffer aufgefüllt, auf die Säule aufgetragen und jeweils nach vollständigem Durchlaufen zweimal mit 2 ml Antikörper-Puffer nachgespült. Im Magnetfeld wurden nun die magnetisch markierten Neutrophilen (und die eventuell verbliebenen Monozyten) zurückgehalten, während die unmarkierten Eosinophilen die Säule ungehindert passieren konnten und in einem PP-Röhrchen unter der Säule aufgefangen wurden (Abb. 5).

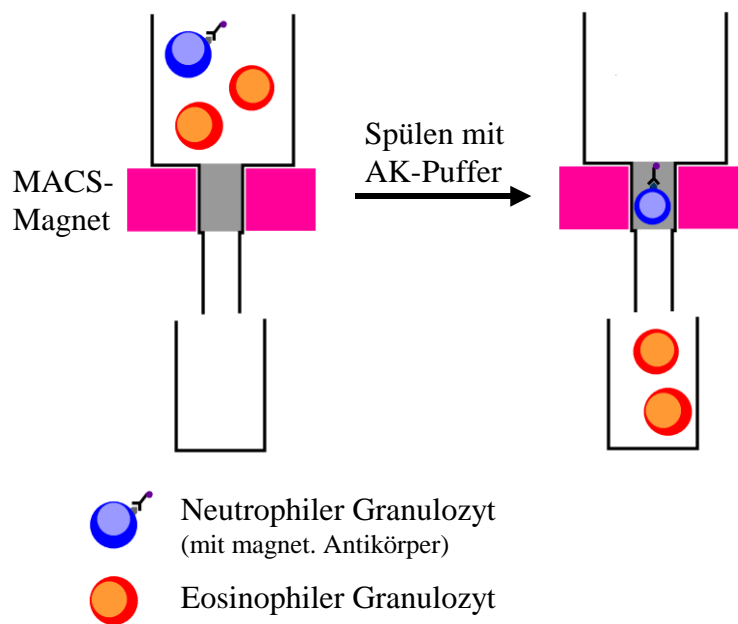


Abb. 5: Zellseparation mit MACS-Säulen

Der magnetisch markierte Antikörper bindet an CD15 auf der Oberfläche von Neutrophilen (links). Dadurch bleiben diese im Magnetfeld der Säule zurück und die unmarkierten Eosinophilen können im Durchlauf aufgefangen werden (rechts).

Bei Bedarf konnten die neutrophilen Granulozyten aus der Säule eluiert werden, nachdem diese aus dem Magnetfeld entfernt worden war. Dazu wurden mittels eines Kolbens die Zellen mit 2 x 3 ml Antikörperpuffer aus der Säule herausgedrückt.

Es folgte noch eine Zentrifugation bei 180 x g für 10 Min., wo die Überstände verworfen und das Eosinophilen- und Neutrophilen-Pellet jeweils in Resuspensions-Puffer resuspendiert werden konnten.

c. Bestimmung der Zellzahl und Viabilität

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte unter dem Mikroskop in einer Neubauer-Zählkammer. Dafür wurde eine 1:20-Verdünnung der Zellsuspension angefertigt und diese mit dem gleichen Volumen an Trypanblau gefärbt. Die gut gemischte Suspension wurde in eine Zählkammer eingefüllt und unter dem Mikroskop vier Quadrate der gerasterten Kammer ausgezählt. Unter Berücksichtigung der Verdünnung konnte durch das bekannte Volumen der Zählkammer die in der ursprünglichen Zellsuspension vorhandene Konzentration an Zellen bestimmt werden.

Tote Zellen, die sich durch den Farbstoff blau anfärbten, wurden bei der Zählung nicht berücksichtigt.

d. Bestimmung der Reinheit der Zellsuspension

Um die Reinheit der isolierten Zellen zu überprüfen, wurde ein gefärbtes Zytopsin-Präparat angefertigt. Dafür wurden nach der Zählung 50000 Zellen in 50µl suspendiert und mit Hilfe einer Zentrifuge auf einen Objektträger aufgebracht. Das entstandene Präparat wurde mit einem Färbeset zur Schnellfärbung von Differentialblutbildern (Diff-Quik®) nach Anleitung des Herstellers angefärbt und unter dem Mikroskop betrachtet. Es wurden jeweils mindestens 200 Zellen ausgezählt. Der Reinheitsgrad der Isolation betrug mindestens 87% Eosinophile, wobei die verunreinigenden Zellen hauptsächlich Lymphozyten waren.

e. Monozyten- und Lymphozyten-Isolation

Die Blutentnahme und die Zentrifugation mit einem Ficoll-Gradienten wurden ohne die Zentrifugation mit HAES 6% aber ansonsten wie oben beschrieben durchgeführt. Die PBMC-Fraktion wurde abgenommen und nach einem Waschschrift mit PBS in 50 µl Antikörperpuffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 50µl anti-CD14-Immunomagnetic Beads erfolgte eine Inkubation für 15 Min. bei 4°C. Nun wurden die mit anti-CD14 magnetisch markierten Monozyten analog zum oben beschriebenen Protokoll mit dem MACS Cell Separation System von den Lymphozyten getrennt. Dabei konnten die Lymphozyten durch Negativ-Selektion im Durchlauf aufgefangen werden, die Monozyten blieben in der Säule und konnten nach Entfernung derselben aus dem Magnetfeld durch Spülen mit Antikörperpuffer eluiert werden. Die Zählung der Zellen erfolgte nach oben beschriebenem Protokoll.

f. LPS-Stimulation von Monozyten

Wurden Monozyten als Positivkontrolle eingesetzt, so wurden sie zuvor mit LPS stimuliert. Dazu wurden die isolierten Monozyten in Resuspensionspuffer gelöst und im Wasserbad bei 37°C für 6 h mit LPS in einer Endkonzentration von 1,5 µg/ml stimuliert. Anschließend

erfolgte ein Waschschrift und die Zellen wurden je nach Versuch analog zu den Eosinophilen verwendet.

g. Thrombozyten-Isolation

Das antikoagulierte Vollblut wurde in 10 ml PP-Röhrchen bei 180 x g für 15 Min. zentrifugiert und anschließend jeweils die obersten 2 ml des thrombozytenreichen Plasma-Überstandes abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. In einigen Versuchen kam dieses plättchenreiche Plasma (PRP) auch direkt zur Anwendung.

Um eine übermäßige Aktivierung der Thrombozyten und somit ein Verklumpen zu verhindern, wurden pro 1ml Plasma 2µl Apyrase (Endkonz. 0,1 U/µl) zugegeben und für 15 Min. inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 390 x g für 10 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Resuspensions-Puffer gelöst. Die Zählung der Thrombozyten erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer wie oben beschrieben.

3. Bestimmung von Eosinophil Cationic Protein (ECP)

Um die Effektivität der Eosinophilen-Aktivierung zu überprüfen wurde ein allgemein anerkannter Assay zur Aktivitätsbestimmung von Eosinophilen angewendet.

In den spezifischen Granula von Eosinophilen befinden sich mehrere Proteine, die bei einer Aktivierung der Zellen ausgeschüttet werden. Dazu gehört auch das ECP (*eosinophil cationic protein*). Da ECP ausschließlich in eosinophilen Granulozyten vorkommt, kann dieses Protein zur Aktivitätsbestimmung der Eosinophilen benutzt werden.

Protokoll zur ECP-Bestimmung

In einem Ansatz von insgesamt 45 µl wurden 50000 Eosinophile mit dem entsprechenden Stimulus versetzt und bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Um die Stimulierung zu stoppen, wurden die Proben in einer Eppendorf-Zentrifuge 5 Min. bei 2260 x g zentrifugiert und anschließend 40 µl des Überstandes vorsichtig abgenommen und in ein neues Cap überführt. Dabei wurde darauf geachtet, nichts von dem am Boden des Caps befindlichen Eosinophilen-Pellets aufzuwirbeln. Die Proben wurden bis zur Messung bei -20°C gelagert.

Die Bestimmung der ECP-Aktivität erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenz-Enzym-Immuno-Assays (UniCAP ECP) nach den Angaben des Herstellers. Die Proben wurden dazu in mit Antikörper gegen ECP gecoatete Reaktionsgefäße pipettiert. Durch einen Waschschrift wurde ungebundenes Protein entfernt. Das gebundene ECP wurde nun mit einem zweiten Antikörper, der ein Chromophor trägt, inkubiert. Nach Entfernung des überschüssigen Zweitantikörpers durch erneutes Waschen konnte die Farbreaktion gestartet werden. Die exakte ECP-Konzentration in der Probe wurde durch Vergleich mit einer Standardkurve bekannter ECP-Konzentrationen ermittelt.

4. Elektronenmikroskopie

In einem Transmissions-Elektronenmikroskop, wie es hier zur Anwendung kommt, wird ein gebündelter Elektronenstrahl von einer „Elektronenkanone“ ausgesandt. Dabei werden die Elektronen von einer Glühkathode abgegeben, mittels eines negativ geladenen Wehnelt-Zylinders gebündelt und mit einer Lochanode beschleunigt. Um eine Beeinträchtigung des Elektronenstrahls durch Luftmoleküle zu verhindern, befindet sich das gesamte System in einem Hochvakuum. Bevor der Elektronenstrahl die Probe erreicht, wird er mittels eines Kondensors gleichgerichtet, damit die Probe mit gleichmäßiger Elektronendichte geradlinig durchstrahlt werden kann. Die Elektronen werden beim Durchtritt durch die Probe gestreut und das dadurch entstandene Bild wird mit elektromagnetischen Linsen vergrößert. Schließlich kann das Bild auf einem Leuchtschirm dargestellt und zur Dokumentation mit einer Kamera aufgezeichnet werden.

Um in den Ultradünnschnitten der untersuchten Zellen das TF-Antigen darzustellen, kam ein doppeltes Antikörperverfahren zur Anwendung: Zuerst wurde mit einem anti-TF-Antikörper, der in Mäusen hergestellt wurde, der vorhandene TF markiert. Überschüssiger Primäntikörper wurde durch einen Waschschrift entfernt. Ein gegen Maus-IgG gerichteter Zweitantikörper aus der Ziege, der mit ca. 10 nm großen Goldkörnern gekoppelt ist, bindet nun im zweiten Schritt an den an TF gebundenen Primäntikörper. Wiederum nach Entfernen des nicht gebundenen Zweitantikörpers konnte nun im Elektronenmikroskop die Lokalisation der Goldkorn-markierten Sekundäntikörper identifiziert werden.

a. Präparation und Einbettung der Zellen

Versuchsprotokoll: Vollblut und Knochenmark

Um eine vorzeitige Aktivierung der Zellen zu vermeiden, wurde bereits während der Blut- bzw. Knochenmarkentnahme eine Vorfixation der Zellen mit 50µl PFA-GA-Fixationslösung pro Milliliter Vollblut durchgeführt. Nach der Zentrifugation wurde der zellarme Überstand verworfen, das Pellet mit PFA-GA-Fixationslösung überschichtet und für 30 Min. bei 4°C fixiert. Die obere Schicht, die Plättchen und Leukozyten enthält, wurde dann in kleine Blöckchen geschnitten. Diese wurden in Cacodylatpuffer mit 2,3 M Saccharose gewaschen.

Versuchsprotokoll: Isolierte und stimulierte Eosinophile

Die Eosinophilen wurden wie zuvor beschrieben isoliert. Danach wurden die Zellen bei 37°C im Wasserbad für 20 Min. mit GMCSF vorinkubiert (Endkonz. 50 ng/ml) und anschließend nach Zugabe von PAF (Endkonz. 10 µM) für weitere 25 Min. unter denselben Bedingungen inkubiert. Nach Abschluss der Stimulation erfolgte eine Vorfixation mit PFA-GA-Fixationslösung (0,5µl/ml Zellsuspension) für mindestens eine Stunde. Die Probe wurde anschließend für 20 Min. bei 2000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen, das Sediment im Wasserbad auf 37°C erwärmt und vorsichtig mit gleichem Volumenteil einer 3%igen Gelatinelösung vermischt. Die auf Raumtemperatur abgekühlte Probe wurde nun mit PFA-GA-Fixationslösung überschichtet und nach 20 Min. wurde das erstarrte Sediment vorsichtig mit einem Skalpell von der Wand des Reaktionsgefäßes abgelöst. Das entstandene Gelatine-Blöckchen wurde mit einer scharfen Klinge in kleine Würfel mit ca. 1 mm Kantenlänge geschnitten und nochmals für 30 Min. bei 4°C in PFA-GA-Fixationslösung nachfixiert. Anschließend wurden die Blöckchen in 0,1 M Cacodylatpuffer mit 7,55% Saccharose (pH 7,2) gewaschen und bis zur Analyse in diesem Puffer bei 4°C aufbewahrt.

Alle Proben wurden vor der Mikroskopie bei -180°C in flüssigem Propan eingefroren. Die gefrorenen Proben wurden anschließend mit Ethanol dehydriert und unter fortschreitender Temperaturerniedrigung bei -30°C in Lowicryl HM20 eingebettet. Es folgte die Anfertigung von Ultradünnschnitten.

b. Immunolabelling der Ultradünnschnitte

Die Ultradünnschnitte der Zellen wurden für 1 h bei Raumtemperatur mit einem mouse-anti-TF-Antikörper (VD8) inkubiert. Nach einem Waschschrift folgte dann die Inkubation mit dem mit Goldkörnern markierten Sekundärantikörper und die Untersuchung der Proben unter dem Elektronenmikroskop EM 109 (Carl Zeiss, Oberkochen).

Die Untersuchungen am Elektronenmikroskop wurden von Herrn Prof. Dr. E. Morgenstern, Institut für Molekulare Zellbiologie, Universität des Saarlandes, durchgeführt.

5. Double Sandwich ELISA

Die Konzentration von TF in Eosinophilen wird mit Hilfe eines Double-Sandwich-ELISA in Zell-Lysaten von stimulierten und unstimulierten Zellen bestimmt.

Eine Mikrotiterplatte wird mit einem Antikörper gegen das zu detektierende Protein (hier: TF) beschichtet. Nach Entfernung von überschüssigem (d.h. nicht-gebundenem) Erstantikörper wird das zu analysierende durch Tau- und Gefrierzyklen gewonnene Zell-Lysat aufgetragen. Der in der Probe vorhandene TF bindet nun an den Erstantikörper. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgt dann die Zugabe eines peroxidasegekoppelten zweiten Antikörpers gegen TF, der an ein anderes Epitop von TF bindet als der Erstantikörper. Nach der Inkubation wird überflüssiger Antikörper wiederum durch einen Waschschrift entfernt. Das anschließend beigefügte Substrat O-Phenyl-diamin (OPD) wird durch die an den Zweitantikörper gebundene Peroxidase umgesetzt und das entstehende Produkt kann im Photometer quantitativ nachgewiesen werden. Die Bestimmung der tatsächlich in der Probe vorhandenen TF-Konzentration erfolgt durch eine gleichzeitig gemessene Standardkurve mit rekombinantem TF bekannter Konzentration.

Versuchsprotokoll: TF-Gehalt von Eosinophilen

Eosinophile wurden nach obenstehendem Protokoll isoliert. Die isolierten Zellen wurden in zwei Ansätze aufgeteilt: Die eine Hälfte wurde bei 37°C im Wasserbad für 45 Min. inkubiert (unstimulierte Kontrolle), die andere Hälfte wurde für 20 Min. mit GMCSF (Endkonz. 50 ng/ml) vorinkubiert und anschließend für 25 Min. mit PAF (Endkonz. 10 µM) ebenfalls bei

37°C stimuliert. Nach Abschluss der Stimulation wurden beide Ansätze bei 2200 x g für 5 Min. zentrifugiert und die Überstände vollständig verworfen. Die trockenen Pellets wurden durch mehrere Gefrier- und Tauzyklen (-20°C) lysiert und bis zur Analyse tiefgefroren aufbewahrt.

Die Zell-Lysate wurden mit einer Detergenslösung für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Parallel wurden die Mikrotiterplatten mit je 50 µl anti-TF-Antikörper VIC7 pro Well bestückt und für 20 h bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen und einer einstündigen Inkubation mit ELISA Waschpuffer zur Minimierung unspezifischer Bindungen konnten jeweils 50 µl des Zell-Lysates in die einzelnen Wells gefüllt werden. Es erfolgte eine Inkubation für 2 h bei 37°C. Anschließend wurde ein peroxidasegekoppelter zweiter anti-TF-Antikörper (IID8) zugegeben und für weitere 2 h bei Raumtemperatur mit dem Substrat O-Phenyl-diamin (OPD) inkubiert. Als Vergleichs-Standardkurve wurde rekombinanter TF verwendet. Die Messung erfolgte im ELISA-Reader bei 492 nm.

Die Untersuchungen zur TF-Konzentrationsbestimmung wurde in Kooperation mit Herrn PD Dr. Thomas Luther (Institut für Pathologie, TU Dresden) durchgeführt.

6. Flowzytometrie mit stimulierten Eosinophilen

Die Durchflußzytometrie ist eine Technik, bei der Zellen einer Suspension einzeln durch einen Laserstrahl (in der Regel einen Argon Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm) geleitet werden. Das Laserlicht wird dabei in unterschiedliche Richtungen abgelenkt. Das vorwärts gestreute Licht (*forward scatter*; FSC) erlaubt eine Aussage über die relative Größe der Zellen, das im 90°-Winkel gestreute Licht (*sideward scatter*; SSC) über die Granularität der Zelle. Ein weiterer gemessener Parameter ist die Fluoreszenz. Es können bestimmte Antigene auf einer Zelle mit Antikörpern, die mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt sind, markiert werden. Außerdem gibt es bei einigen Zellen eine gewisse Eigenfluoreszenz. Trifft nun der Laserstrahl auf den Fluoreszenzfarbstoff werden dessen Elektronen auf ein instabiles höheres Energieniveau angehoben. Kehren die Elektronen auf das ursprüngliche Niveau zurück, wird Licht geringerer Energie (und größerer Wellenlänge) frei. Sowohl das gestreute als auch das Fluoreszenzlicht wird zu Photodetektoren gelenkt und dort in elektrische Impulse umgewandelt, die im Computer gespeichert werden.

Es können also folgende Parameter bei jeder Zelle simultan bestimmt werden:

8. *forward scatter* (Größe)
9. *sideward scatter* (Granularität)
10. FL1 (detektiert FITC (Fluoreszenzisothiocyanat), Emissionsmaximum um 520 nm)
11. FL2 (detektiert PE (R-Phycoerythrin), Emissionsmax. um 575 nm)
12. FL3 (detektiert z.B. PER-CP (Peridinin-Chlorophyll-a), Emissionsmax. 680 nm)
13. FL4 (durch einen zusätzlichen Laser, der rotes Licht mit einer Wellenlänge von 633 nm aussendet, ist es möglich noch eine vierte Fluoreszenz zu messen. Detektiert wird z.B. APC (Allophycocyanin), Emissionsmax. um 660 nm)

In dieser Arbeit wurde allerdings nur FL1 und FL2 verwendet. Die Messungen erfolgten an einem Beckman Coulter® EPICS XL-MCL mit einem Argon-Laser der blaues Licht der Wellenlänge 488 nm emittiert. Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit der Expo32 ADC-Software.

Versuchsprotokoll: TF-Expression auf stimulierten Eosinophilen

Pro Ansatz wurden je 5×10^5 Eosinophile in 100µl Resuspuffer suspendiert. Nun erfolgte eine Stimulation der Zellen im Wasserbad bei 37°C. Dabei erfolgte zuerst eine Vorinkubation der Zellen mit GMCSF (Endkonz. 50 ng/ml), nach 20 Minuten dann die eigentliche Stimulation für 25 Min. durch Zugabe von PAF (Endkonz. 10 µM) (Tab. 1).

Tabelle 1:

Eingesetzte Substanzen	GMCSF (50 ng/ml)	PAF (10 µM)
Unstimulierte Kontrolle	-	-
GMCSF	45 min	-
GMSCF/PAF	45 min	25 min

Die Stimulation/Inkubation wurde durch Zugabe von 900 µl Cell-Fix (Becton Dickinson) in einer 1:10 Verdünnung gestoppt, durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren gut gemischt und die Zellen für mindestens 15 Min. bei Raumtemperatur fixiert.

Die fertig fixierten Zellen wurden für 5 Min. bei 2260 x g zentrifugiert, mit PBS gewaschen und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 50 µl verworfen und das Pellet im verbleibenden Volumen resuspendiert. Zum Abblocken unspezifischer Bindungen wurden die

einzelnen Versuchsansätze mit menschlichem IgG in einer Endkonzentration von 50 µg/ml für 30 Min. vorinkubiert. Die Fluoreszenz-Färbung erfolgte durch Zugabe von jeweils 5 µl der verschiedenen fluoreszierendem Antikörper und einer anschließenden Inkubation für 30 Min. bei Raumtemperatur in der Dunkelheit. Dadurch wurde ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes verhindert. Um die Zellen einwandfrei als Granulozyten zu erkennen, kam ein anti-CD15-PE Antikörper (serotec) zur Anwendung. Die TF-Präsentation auf der Oberfläche der Eosinophilen wurde mit einem anti-TF-FITC Antikörper (American Diagnostica) gemessen. Nach der Inkubation wurden die Proben jeweils mit 1 ml PBS aufgefüllt und gut gemischt.

Die Eosinophilen konnten durch den Granulozytenmarker CD15 und durch die Tatsache, dass es sich um isolierte Zellen handelt, im FACS einfach identifiziert werden. Nach entsprechender Einstellung des Flowzytometers wurde um die Eosinophilen-Wolke der unstimulierten Zellen ein Gate gelegt. Es wurden pro Messung jeweils 10000 Ereignisse in diesem Gate gezählt. In den stimulierten Proben konnte so im selben Gate der Anstieg an TF-positiven Zellen gemessen werden.

7. Faktor Xa-Bildung

Die TF-Aktivität in einer Probe kann über einen prokoagulatorischen Aktivitätsassay bestimmt werden. Das Prinzip besteht darin, dass in der Probe vorhandener, biologisch aktiver TF in Anwesenheit aller dazu notwendiger Substrate zur Bildung von Faktor Xa führt. Dabei ist die Menge an entstandenem Faktor Xa proportional der vorhandenen TF-Aktivität.

Die Probe wird dazu mit einem Substratgemisch, das aus den Faktoren II, VII, IX und X (Beriplex) sowie einem chromogenen Substrat (S2222) besteht, gemischt und die Reaktion mit CaCl₂ gestartet. Ist TF in der Probe enthalten, bildet dieser mit den Faktor VIIa (bzw. Faktor VIIa und Faktor IXa) den Tenase-Komplex, der Faktor X zu Faktor Xa aktiviert. Dieser spaltet spezifisch das farblose Substrat Chromogen S2222. Dabei entsteht ein Spaltprodukt mit gelber Farbe. Die Zunahme der Gelbfärbung im Versuchsansatz ist somit proportional der vorhandenen TF-Aktivität und kann in einem ELISA-Reader bei 405 nm in einer 96-well-Platte gemessen werden. Durch den Vergleich mit einem TF-Standard kann die Aktivität der Probe bestimmt werden.

Versuchsprotokoll

In einem Gesamtvolumen von 50 µl wurden jeweils 5×10^5 isolierte Eosinophile in Resuspensionspuffer gelöst und wie folgt bei 37°C im Wasserbad stimuliert. PAF wurde nach 20-minütigem Priming mit GMCSF zugegeben (Tab. 2).

Tabelle 2:

	Eosinophile	GMCSF (50 ng/ml)	PAF (10 µM)
Kontrolle	5×10^5	-	-
GMCSF	5×10^5	45 min	-
GMSCF/PAF	5×10^5	45 min	25 min

In jedes Well einer 96-well-Platte werden 50 µl CaCl_2 vorgelegt. Nach Ablauf der Stimulation kamen je 50 µl Probe oder 50 µl der Standardreihe bekannter TF-Aktivität dazu. Die Reaktion wurde durch Zugabe von jeweils 100 µl Substratgemisch pro Well gestartet und die Extinktionszunahme über die Zeit im ELISA-Reader bei 405 nm gemessen.

8. Real Time PCR

Zu Beginn der Proteinsynthese wird das entsprechende Gen von den Chromosomen des Zellkerns über verschiedene Schritte in mRNA transkribiert, diese kann dann ins Zytoplasma gelangen. Die fertige mRNA dient nun den Ribosomen als Vorlage für die Synthese des Proteins. Wird ein Protein in einer Zelle vermehrt exprimiert (z.B. durch Stimulation), so steigt in der Regel auch die Menge an mRNA des entsprechenden Proteins an.

Aus den zu untersuchenden Zellen wird mRNA isoliert, die dann aufgrund der größeren Stabilität in cDNA umgewandelt wird. Dazu verwendet man das Enzym Reverse Transkriptase sowie einen Oligo (dT) Primer, der komplementär zum Poly-A-Ende der mRNA ist.

Die cDNA des Zielgens wird nun mit Hilfe einer Polymerase-Ketten-Reaktion mit für das Gen spezifischen Primern vervielfältigt, wobei die Anzahl der entstehenden Kopien durch Zugabe eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs (z.B. SYBR Green I) und der während der PCR-Zyklen durchgeführten Fluoreszenzmessungen bestimmt werden kann. Um die Menge an mRNA eines bestimmten Zielgens zu messen, wird parallel die mRNA eines in

jeder Zelle in großer Menge vorkommenden Proteins (sog. *housekeeping gene*; hier: Aldolase) mitbestimmt und der TF-mRNA-Gehalt jeder untersuchten Zellpopulation relativ zu dem *housekeeping gene* gemessen. Die Angaben erfolgen im Vergleich zu einer Positivkontrolle von LPS-stimulierten Monozyten.

Versuchsprotokoll:

RNA-Isolation

Plättchen, unstimulierte Eosinophile, stimulierte Eosinophile, Lymphozyten und LPS-stimulierte Monozyten (= Positivkontrolle) wurden isoliert, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden nun mit jeweils 1 ml TRIzol-Reagenz überschichtet, durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren homogenisiert und danach für 8 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, um ein vollständiges Herauslösen der RNA aus den Proteinkomplexen zu ermöglichen. Dabei wurde die Probe immer wieder per Hand geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 12000 x g, wobei sich die Probe in eine rote untere Schicht, eine mittlere Schicht und eine farblose obere Schicht teilte. Die in der oberen wässrigen Schicht befindliche RNA wurde nun in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 0,5 ml Isopropyl-Alkohol präzipitiert. Nach Inkubation für 10 Min. bei Raumtemperatur erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 12000 x g für 10 Min. bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen. Die Probe wurde mit dem Vortexer gut gemischt, erneut zentrifugiert (7500 x g, 5min, 4°C) und das RNA-Pellet getrocknet. Zum Schluss wurde die RNA durch Auf- und Abpipettieren in RNase-freiem Wasser gelöst.

cDNA-Synthese

Die instabile mRNA wurde nun in cDNA umgeschrieben. Dabei kam jeweils 1 µg Gesamt-RNA mit 25 ng/µl Oligo (dT) Primer und das SUPERScript Preamplification system reverse transcription kit gemäß den Anweisungen des Herstellers zur Anwendung.

Real Time quantitative Polymerase-Kettenreaktion (realtime-PCR)

Die Real-time PCR wurde in einem LightCycler System durchgeführt. Dabei bestand der Reaktionsansatz aus jeweils 13,6 µl Wasser, 2,4µl (4mM) MgCl₂, 0,5 µl (0,4µM) von jedem Primer, 2µl LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I und 1µl cDNA.

Primer für TF : 5'-CCTGGAGACAAACCTCGGACAGCC-3' forward
 5'-CCAGCTCTGCCCCACTCCTGC-3' reverse
Primer für Aldolase: 5'-AGCTGTCTGACATCGCTCACCG-3' forward
 5'-CACATACTGGCAGCGCTTCAAG-3' reverse

Der Reaktionsansatz wurde in eine Glas-Kapillare überführt und es erfolgte eine initiale Denaturierung bei 95°C für 10 min. Anschließend folgten 32 Zyklen unter folgenden Bedingungen:

Denaturierung	95°C	1s
Primerhybridisierung	57°C	5s
Elongation	72°C	20s

Die Expression des Zielgens (TF) wurde durch das Verhältnis von TF-mRNA zu Aldolase-mRNA in jedem Ansatz standardisiert und in Verhältnis zur Positivkontrolle „LPS-stimulierte Monozyten“ gesetzt.

9. Thrombelastographie

Die Thrombelastographie erlaubt eine Bestimmung der Fibrinbildungsrate im Vollblut und somit eine funktionelle Erfassung der Blutgerinnung bis hin zur Fibrinolyse unter Bedingungen, die der tatsächlichen Situation in vivo nahe kommen.

Prinzip

Das Prinzip der Thrombelastographie besteht darin, dass ein Kunststoffstößel in eine mit antikoaguliertem Vollblut gefüllte Kunststoffküvette eintaucht und sich dabei langsam hin- und her dreht. Wird nun durch Zugabe von Ca⁺⁺-Ionen die Gerinnungskaskade wieder gestartet, kommt es zur Bildung von Fibrinpolymeren, die den Stößel mit der Wand der Küvette vernetzen. Dadurch wird der Drehbewegung ein Widerstand entgegengesetzt, der der Menge an gebildeten Fibrinfäden proportional ist. Durch ein spezielles Meßsystem können die veränderten Drehbewegungen als Graph dargestellt und somit Aussagen über die Gerinnungsvorgänge in der Probe getroffen werden.

Dabei kann sowohl die Fibrinbildungsrate (*coagulation time*; CT), also die Zeit vom Start der Messung bis zum Start der Gerinnselbildung, als auch die Thrombuswachstumsrate (*clot formation time*; CFT), also die Zeit vom Beginn der Thrombusbildung bis die Amplitude des Graphen 20 mm beträgt, bestimmt werden. Beide Werte werden in Sekunden gemessen. Die größte Breitenausdehnung des Graphen beschreibt die maximale Gerinnselfestigkeit (*maximal clot firmness*; MCF) und wird in mm angegeben. Zu einem späteren Zeitpunkt der Messung können auch noch Aussagen über die Fibrinolyse getroffen werden (Abb. 6)

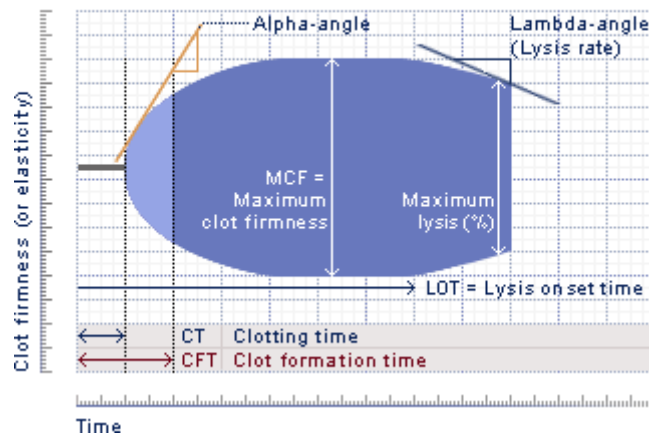


Abb. 6: Meßgrößen der Thrombelastographie
[\[http://www.pentapharm.de\]](http://www.pentapharm.de)

Versuchsprotokoll

Eosinophile Granulozyten wurden nach dem oben beschriebenen Protokoll isoliert.

Anschließend wurde frisches mit Na-Citrat antikoaguliertes Blut abgenommen und daraus plättchenreiches Plasma gewonnen (PRP). Es wurden pro Küvette im Thrombelastographen 300 µl citriertes und mit den entsprechenden Zellen versetztes PRP auf 37°C vorgewärmt. Die Gerinnung wurde durch die Zugabe von jeweils 60 µl einer Calcium-Lösung (100 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7,4) gestartet und die Küvetten sofort in den Thrombelastographen eingebracht. Um die Gerinnung zu stimulieren wurde zu jeder Probe unmittelbar vor der Zugabe der Calcium-Lösung jeweils 4 µl Collagen (entspricht einer Endkonzentration von 12 µg/ml) zugegeben.

In einem ersten Versuch wurden die Eosinophilen unstimuliert verwendet. Sowohl die Neutrophilen als auch die Eosinophilen wurden nach der Isolation gezählt und die jeweils benötigte Menge an Zellen in ein frisches Gefäß gegeben. Anschließend wurden die Zellen in

einer Eppendorf-Zentrifuge 5 min bei 2260 x g zentrifugiert, der Überstand vollständig verworfen und die entstandenen Pellets in 300 µl citriertem PRP resuspendiert. Dabei setzten sich die Proben wie folgt zusammen (Tab. 3).

Tabelle 3:

Probe	PRP	Neutrophile	Eosinophile	Collagen	Ca-Hepes
1	300 µl	-	-	4 µl	60 µl
2	300 µl	-	2×10^5	4 µl	60 µl
3	300 µl	3×10^6	-	4 µl	60 µl
4	300 µl	3×10^6	2×10^5	4 µl	60 µl

Die Reaktion wurde wie oben beschrieben gestartet und die Messung im Thrombelastographen durchgeführt.

In einem zweiten Versuch wurde der Einfluß von stimulierten Eosinophilen auf die Gerinnung untersucht. Um eine Verfälschung durch die verwendeten Stimuli auszuschließen, wurden diese auch der Kontrolle zugefügt.

Es wurden 2×10^5 isolierte Eosinophile in 300 µl Resuspensionspuffer resuspendiert und für 20 min bei 37 °C mit GMCSF (50 ng/ml) geprimt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 2260 x g für 5 min und danach wurde der Puffer vollständig entfernt und verworfen. Die geprimten Eosinophilen wurden in 300 µl frischem citriertem PRP resuspendiert, GMCSF (50 ng/ml) wieder zugegeben und die Probe mit PAF (10 mM) für weitere 25 min bei 37°C im Wasserbad stimuliert. Für die Kontrolle wurden 300 µl PRP mit 50 ng/ml GMCSF und 10 mM PAF ohne Eosinophile ebenfalls für 25 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Proben in die TEG-Küvetten überführt, 4 µl Collagen-Reagenz und 60 µl Ca-Hepes zugegeben und die Messung wie beschrieben durchgeführt.

10. Transmigrationskammer

Die Transmigration von Leukozyten durch Endothel sollte *in vitro* unter möglichst physiologischen Bedingungen untersucht werden. Dazu kam eine Strömungskammer mit parallelen Platten zur Anwendung, die die Simulation eines laminaren Flusses analog zur Situation in den Blutgefäßen ermöglicht.

In der Kammer werden die isolierten Zellen in einem Medium mit einer definierten Scherspannung (die sich aus der Geometrie der Kammer, der Viskosität des Mediums und der Volumen-Flußrate errechnet) über eine einlagige, konfluente Schicht aus Endothelzellen geleitet. Mit Hilfe einer Kamera kann dann das *rolling*, die Bindung und schließlich die Diapedese von Zellen durch die Endothelschicht dokumentiert werden.

Versuchsprotokoll

Die Untersuchungen mit der Transmigrationskammer wurden von Dr. S. Cuvelier und Prof. Kamala D. Patel, Canada Research Chair in Leukocyte Trafficking, University of Calgary, Canada durchgeführt.

Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC) wurden auf Objektträgern kultiviert. In allen Experimenten wurden die Zellen zwei Tage nachdem sich eine einlagige, konfluente Schicht auf dem Objektträger gebildet hatte verwendet.

Die Endothelzellen wurden zunächst mit IL-4 vorstimuliert. Anschließend wurde der Objektträger in die Strömungskammer eingebracht und eine Suspension von frisch isolierten Eosinophilen mit einer Scherspannung darübergeleitet. Um eine weitere Bindung von Eosinophilen an die Endothelschicht zu verhindern, wurde je nach Versuch nach 4 Min. oder nach 7 Min. Perfusion die Zellsuspension durch Puffer ersetzt und die Kammer bei gleicher Scherspannung für weitere 3 Min. durchspült. Zur späteren Analyse wurden die mit dem Endothel in Kontakt stehenden Zellen mittels einer CCD-Kamera in 200 oder 400facher Vergrößerung aufgenommen (Abb. 7). Zu festgelegten Zeiten wurden die Zellen in 4-6 unterschiedlichen Feldern ausgezählt und die angesammelten Eosinophilen (sowohl im Stadium des *rolling* als auch die fest adhärenen Zellen) und die Zahl der bereits transmigrierten Leukozyten bestimmt. Bei *rolling* und *adhesion* auf der Oberfläche der Endothelschicht erscheinen die Zellen hell und rund, die bereits transmigrierten Zellen erscheinen dunkel und abgeflacht. Die Transmigrationsrate wurde durch die Anzahl der transmigrierten Zellen geteilt durch die Gesamtzellzahl bestimmt.

In einigen Experimenten wurden die Eosinophilen und die HUVECs mit anti-TF-Antikörpern (VIC7 oder VD8) vorinkubiert.

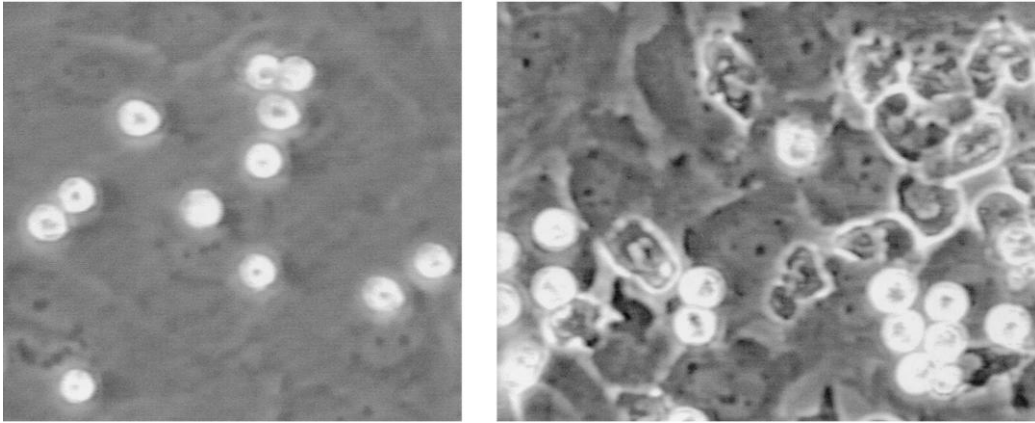


Abb. 7: Beispiel für Bilder aus einer Transmigrationskammer. Links sind die adhärennten Zellen gut als helle runde Strukturen zu erkennen. Im rechten Bild ist etwa die Hälfte der sichtbaren Zellen transmigriert. Die Zellen auf der anderen Seite der Endothelschicht erscheinen dunkel und abgeflacht.

[S. Cuvelier et al ; *J. Exp. Med.* Vol.194, No. 12, Dec 17, 2001]

11. Materialien/Puffer

Puffer

Resuspensionspuffer:

138 mM NaCl	Roth, Karlsruhe
2,7 mM KCl	Roth, Karlsruhe
12 mM NaHCO ₃	Roth, Karlsruhe
0,4 mM NaH ₂ PO ₄	Roth, Karlsruhe
1 mM MgCl ₂ *6 H ₂ O	Roth, Karlsruhe
5 mM D-Glucose	Roth, Karlsruhe
5 mM Hepes	Roth, Karlsruhe
pH mit 1 N NaOH bzw. HCl auf pH 7,35 eingestellt	

PBS

138 mM NaCl	Roth, Karlsruhe
1,5 mM KH ₂ PO ₄	Roth, Karlsruhe
8 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	Roth, Karlsruhe
2,7 mM KCl	Roth, Karlsruhe
pH mit 1N NaOH bzw. HCl auf pH 7,4 eingestellt	

Eosinophilen-Isolation

HAES 6%

90ml HAES 10% + 60ml NaCl 0,9%

Antikörperpuffer

EDTA 0,15%

BSA Fraktion V, 0,5%

Gelöst in PBS, auf pH 7,4 eingestellt

Material:

HAES 10%	Fresenius Kabi, Bad Homburg
NaCl	Roth, Karlsruhe

EDTA freie Säure	Roth, Karlsruhe
BSA Fraktion V	Serva, Heidelberg

Ficoll-Paque	Pharmacia, Freiburg
--------------	---------------------

anti-CD16 immunomagnetic beads	Miltenyi biotech, Bergisch Gladbach
anti-CD14 immunomagnetic beads	Miltenyi biotech, Bergisch Gladbach
MACS cell separation system	Miltenyi biotech, Bergisch Gladbach

Diff-Quick [®]	Dade Behring, Marburg
-------------------------	-----------------------

Zell-Stimulation

GMCSF (Granulocyte-macrophage- colony-stimulating-factor)	Leucomax [®] 150(Novartis), Basel/Schweiz
PAF (platelet activating factor)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Flowzytometrie

Cell-Fix Human IgG	Becton Dickinson, Heidelberg Calbiochem,
Anti-CD15-PE Anti-TF (Tissue factor)-FITC	Serotec, Düsseldorf American diagnostica, Greenwich

Elektronenmikroskopie

Cacodylatpuffer

21,4 g Na(CH₃)₂As₂ in 500 ml Aqua dest. Lösen
tropfenweise mit 1 N HCl auf pH 7,4 titrieren

PFA-GA-Fixationslösung

3,0 % Paraformaldehyd (PFA)
0,1 % Glutaraldehyd (GA)
gelöst in 0,1 M Cacodylatpuffer

Stammlösung: 3 g Paraformaldehyd in 50 ml Aqua dest.
unter Rühren auf 65°C erhitzen,
1 Tropfen 10 N NaOH zugeben bis die Trübung verschwindet,
0,1 % Glutaraldehyd zusetzen
mit Cacodylatpuffer auf 100 ml auffüllen

Aufbewahrungspuffer

0,1 M Cacodylatpuffer pH 7,2
7,55 g Saccarose pro 100 ml

Material:

Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
Glutaraldehyd	Roth, Karlsruhe
Cacodylsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Gelatinepulver	Merck, Darmstadt
Lowicryl HM20	Chem. Werke Lowi, Waldkraiburg

Antikörper

gold-labeled goat anti-rabbit 10nm	Aurion, Wageningen/Netherlands
mouse-anti human-TF IgG (VD8)	PD Dr. Luther, Inst.f.Pathologie, Dresden

Xa-Bildung

Beriplex P/N 500
S2222
Thromborel S
CaCl₂

Aventis Behring, Marburg
Hämochrom Diagnostica, Essen
Dade Behring, Marburg
Roth, Karlsruhe

Double Sandwich ELISA

Detergenslösung

0,05 M Tris/HCl
0,1 M NaCl
0,1% Triton X-100
5mM EDTA
pH mit 1 N NaOH bzw. HCl auf pH 7,6 eingestellt

Material

Mouse-anti-human-TF-VIC12	PD Dr. Luther, Inst.f.Pathologie, Dresden
Mouse-anti-human- TF-VIC7(peroxidase+)	PD Dr. Luther, Inst.f.Pathologie, Dresden
Substrat OPD (O-Phenylen-diamin)	Fluka, Schweiz

IV. Ergebnisse

1. Nachweis von TF in hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark

Zunächst wurde mittels Immunfluoreszenz-Elektronenmikroskopie untersucht, welche Vorläuferzellen der myelozytären Reihe im Knochenmark des Menschen TF exprimieren. Dazu wurde das Knochenmark sofort nach der Entnahme mit einer Fixationslösung fixiert, die angereicherte Leukozytenfraktion in Acryl eingebettet und anschließend Ultradünnschnitte angefertigt. Mit Hilfe eines anti-TF-Antikörpers (VD8) und eines goldmarkierten Zweitantikörpers wurde der in den Vorläuferzellen vorhandene TF detektiert. Dabei wurden die verschiedenen Zellarten jeweils durch ihre charakteristische Morphologie im EM-Bild identifiziert.

Neutrophile Metamyelozyten erkennt man an ihrem typischen eingekerbten Kern mit scholligem Chromatin und dem Vorhandensein von zwei Populationen verschiedener Granula. Die erste Population (im EM-Bild rundovale elektronendichte Granula) entsteht bereits im Promyelozytenstadium und wird als Primärgranula bezeichnet, die zweite Population entsteht später und wird Sekundär- oder spezifische Granula genannt. Wie Abb. 8 zeigt, konnte in diesen spezifischen Granula vereinzelt intrazellulärer TF nachgewiesen werden (Abb. 8). Auch neutrophile Myelozyten enthielten geringe Mengen an TF (*nicht gezeigt*).

Basophile Myelozyten fallen im Elektronenmikroskop vor allem durch ihre zahlreichen meist runden, mit grobkörnigem elektronendichten Material gefüllten Granula auf. In diesen Granula der Basophilen war relativ häufig TF nachweisbar (Abb. 9).

Eosinophile Granulozyten und ihre Vorläuferzellen weisen nur eine einzige Population von Granula auf. Im Promyelozyten finden sich im EM-Bild runde, homogen elektronendichte Granula, die im eosinophilen Myelozyten dann erste - für die spezifischen Granula typische - kristalloide Strukturen entwickeln. Abb. 10 zeigt einen eosinophilen Myelozyten mit den oben beschriebenen Granula. Wie anhand der zahlreichen Goldkörner ersichtlich, konnte hier überraschenderweise in großen Mengen TF nachgewiesen werden (Abb. 10). Dabei waren die TF-Expressionslevel deutlich höher als in den Vorläuferzellen von Basophilen und Neutrophilen.

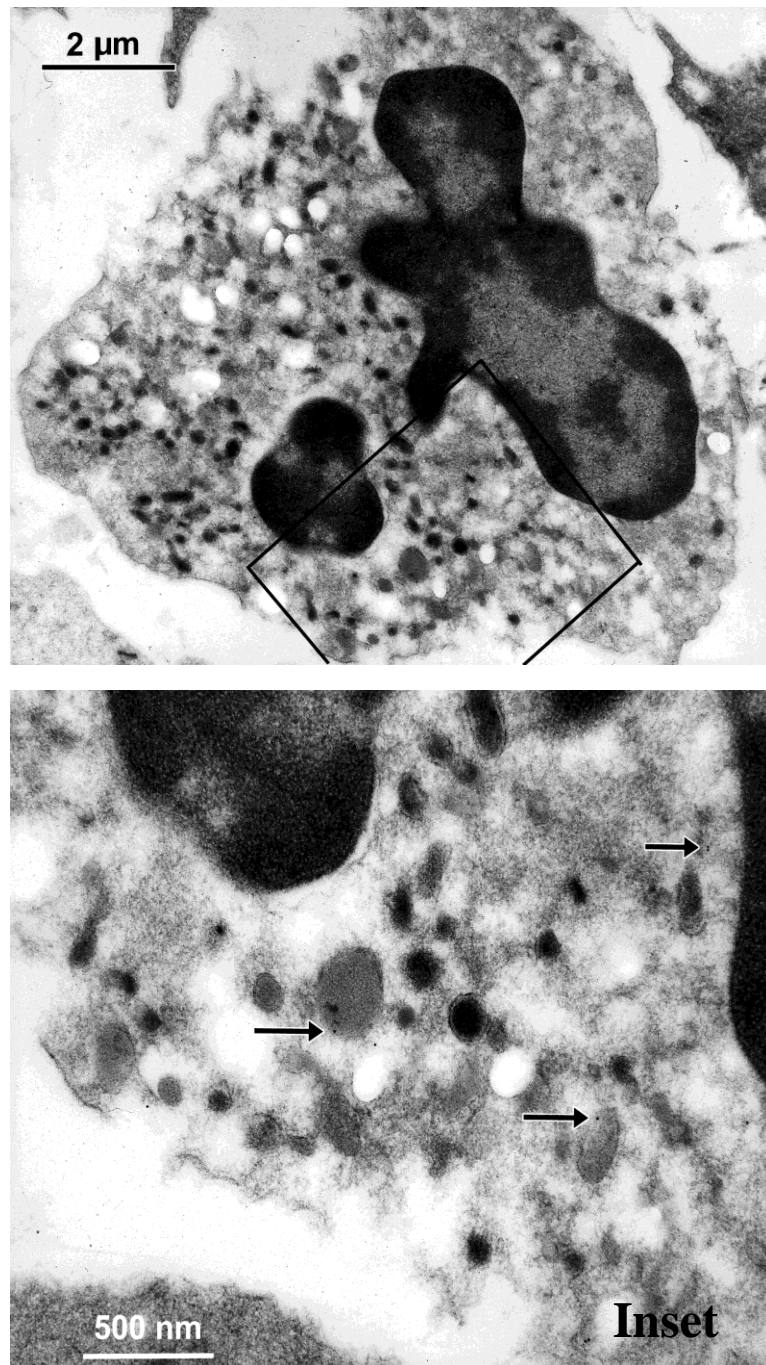


Abb. 8: Nachweis von TF in neutrophilem Metamyelozyten, in der Vergrößerung des Ausschnittes (unten) sind die Goldkörner in den Granula zu erkennen (Pfeile).

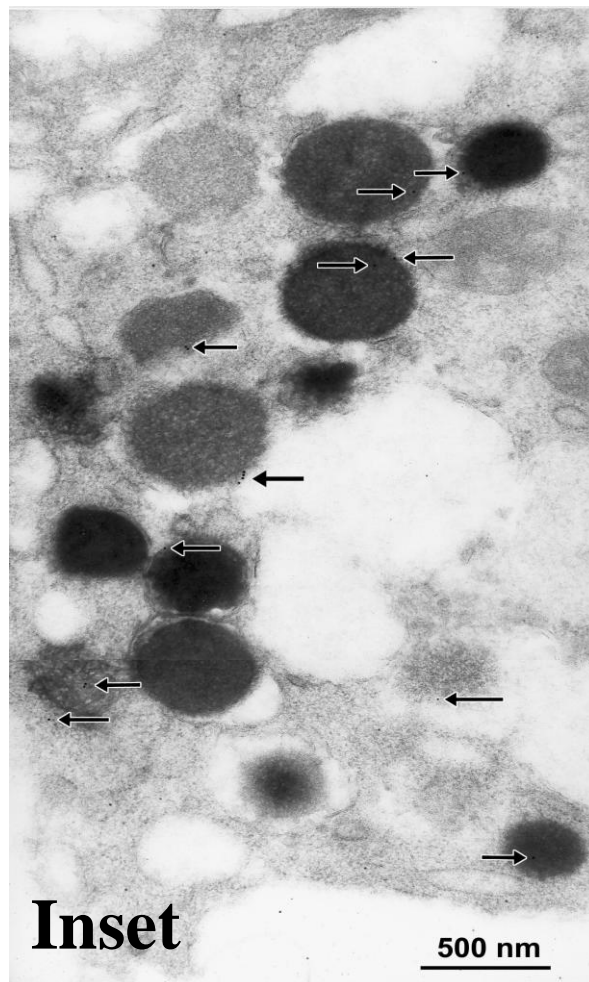
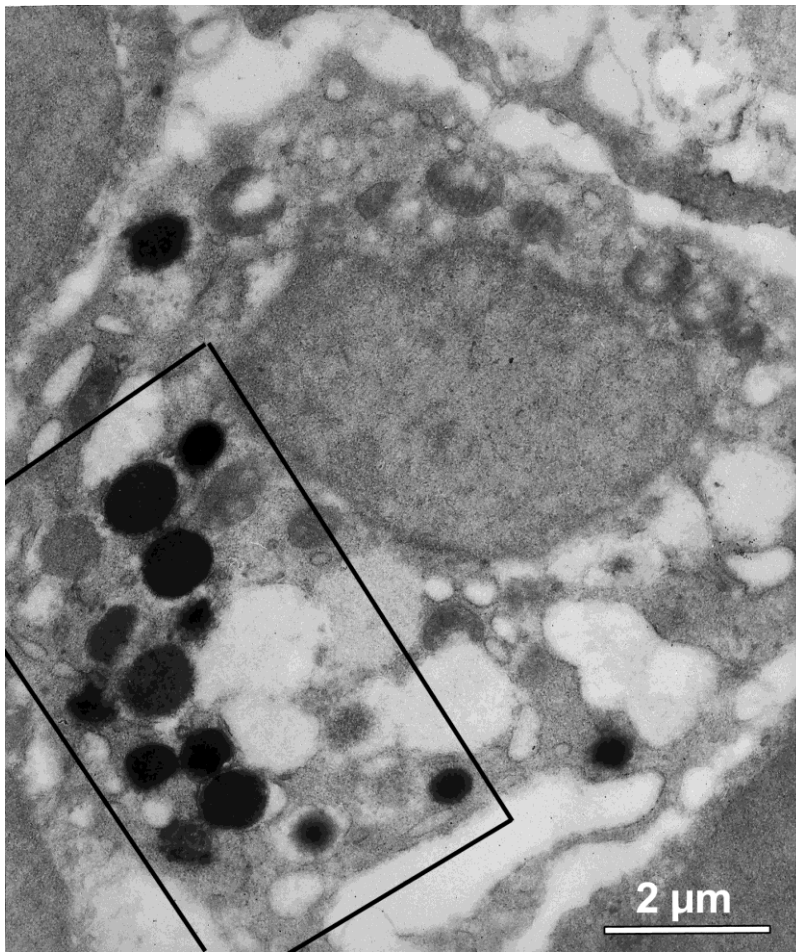


Abb. 9: Nachweis von TF in basophilem Myelozyten. In der Vergrößerung des Ausschnittes (unten) sind die Goldkörner in den Granula zu erkennen (Pfeile).

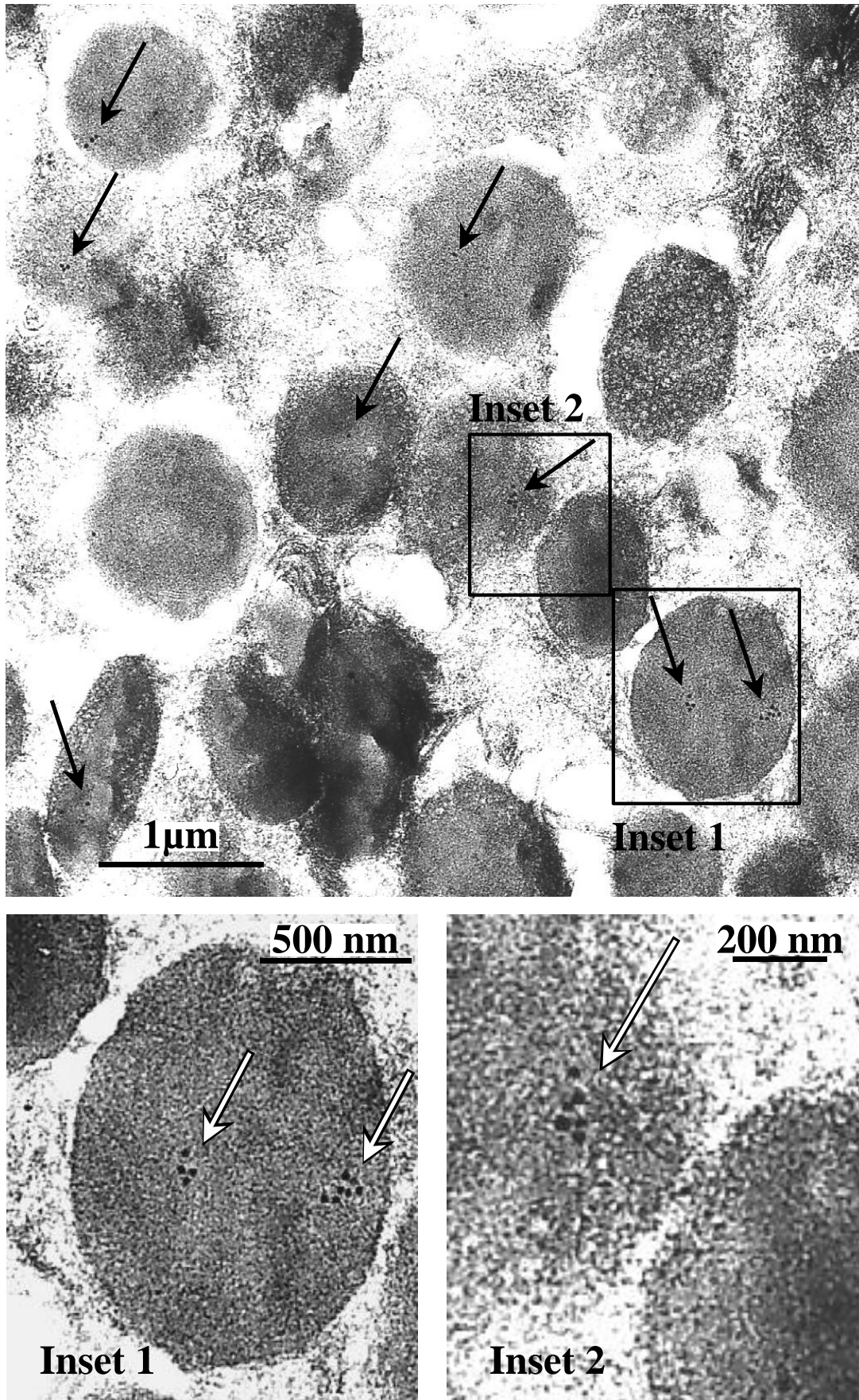


Abb. 10: Nachweis von TF in eosinophilem Myelozyten (argininreiche Kristalle in intrazellulären Granula). In den Ausschnitten unten sind die zahlreichen Goldkörner in den Granula zu erkennen (Pfeile).

2. Expression von TF in reifen Eosinophilen im peripheren Blut

Da sich im Zuge der Differenzierung zu reifen Zellen das Proteinprofil durch Katabolismus oder Neusynthese/Aufnahme von Proteinen grundlegend ändern kann, stellt sich nun die Frage, ob auch die Zellen des peripheren Blutes noch TF enthalten. Deshalb wurden die reifen Zellen der myelozytären Reihe auf Ihren TF-Gehalt hin untersucht.

Dazu wurden frische Blutproben von gesunden Probanden wiederum im Elektronenmikroskop analysiert. Um nur präformierten, in den Zellen bereits vorhandenen und nicht etwa durch *de novo*-Synthese entstandenen TF zu erfassen, musste eine Aktivierung der untersuchten Blutzellen unbedingt vermieden werden. Deshalb wurden die Blutproben während der Abnahme nicht nur mit einem Antikoagulans, sondern auch mit einer speziellen Fixationslösung versetzt. Anschließend folgte die Visualisierung der mit anti-TF-Antikörper und goldmarkierten Zweitantikörper behandelten Schnitte im Elektronenmikroskop.

Abb. 11 zeigt einen reifen neutrophilen Granulozyten mit dem typischen segmentierten Kern und zahlreichen Primär- und Sekundärgranula. Wie bereits in den Vorläuferzellen beobachtet war auch in den reifen Neutrophilen kaum TF nachweisbar (Abb. 11).

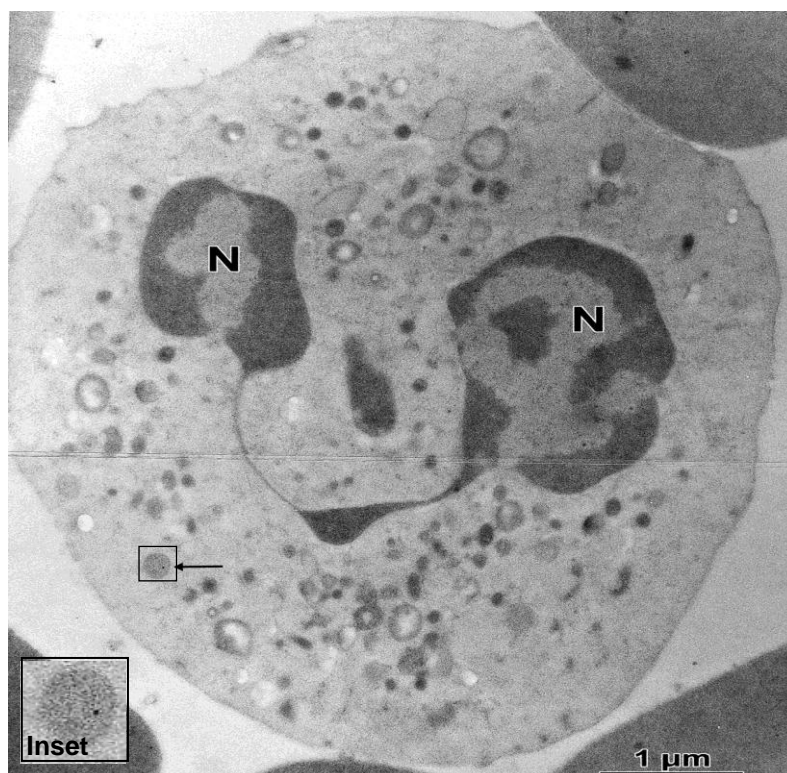


Abb. 11: Analyse der Anwesenheit von präformiertem TF in reifem neutrophilen Granulozyten. Der Pfeil markiert ein einziges detektierbares Goldkorn in einem spezifischen Granulum. Das Inset links unten zeigt das fragliche Granulum in Vergrößerung.

In reifen basophilen Granulozyten war im Gegensatz zu den basophilen Myelozyten kaum mehr TF vorhanden (*nicht gezeigt*). Die Basophilen scheinen den intrazellulären TF also im Laufe ihrer Entwicklung zur reifen Zelle zu verlieren.

Es wurden auch ruhende reife Monozyten untersucht. Diese sind erkennbar an ihrem typisch nierenförmigen Kern und der im Vergleich zum Neutrophilen geringeren Anzahl an Granula. Dabei fand sich nur eine geringe TF-Expression in der perinukleären Region (Abb. 12).

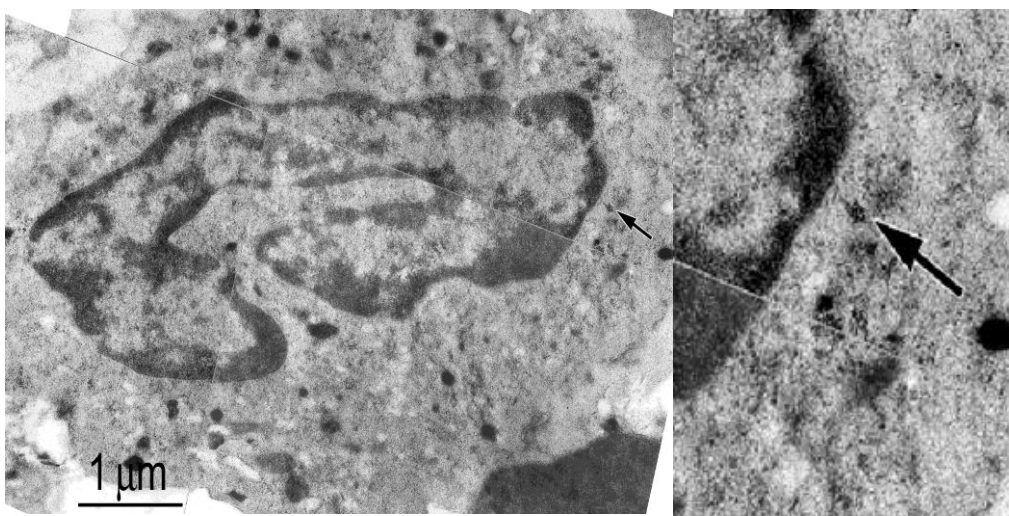


Abb. 12: Analyse der Anwesenheit von präformiertem TF in reifen Monozyten. Perinukleäre Goldkörner (Pfeil) in einem ruhendem Monozyten aus dem peripheren Blut.

Da monozytäre Vorläuferzellen bekannterweise TF exprimieren [Stephens, 1994], ist davon auszugehen, dass die TF-Expression während der Reifung abnimmt. Allerdings sind reife Monozyten durch Stimulation mit LPS in der Lage TF *de novo* zu synthetisieren [Rivers, 1975].

Reife eosinophile Granulozyten können im Elektronenmikroskop durch ihren bilobulär segmentierten Kern und die zahlreichen spezifischen Granula mit den typischen kristalloiden Innenkörpern problemlos identifiziert werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Basophilen und Monozyten konnte in reifen Eosinophilen in erheblichem Ausmaß

goldmarkierter TF nachgewiesen werden. Dieser befand sich zum größten Teil innerhalb der spezifischen Granula (Abb. 13).

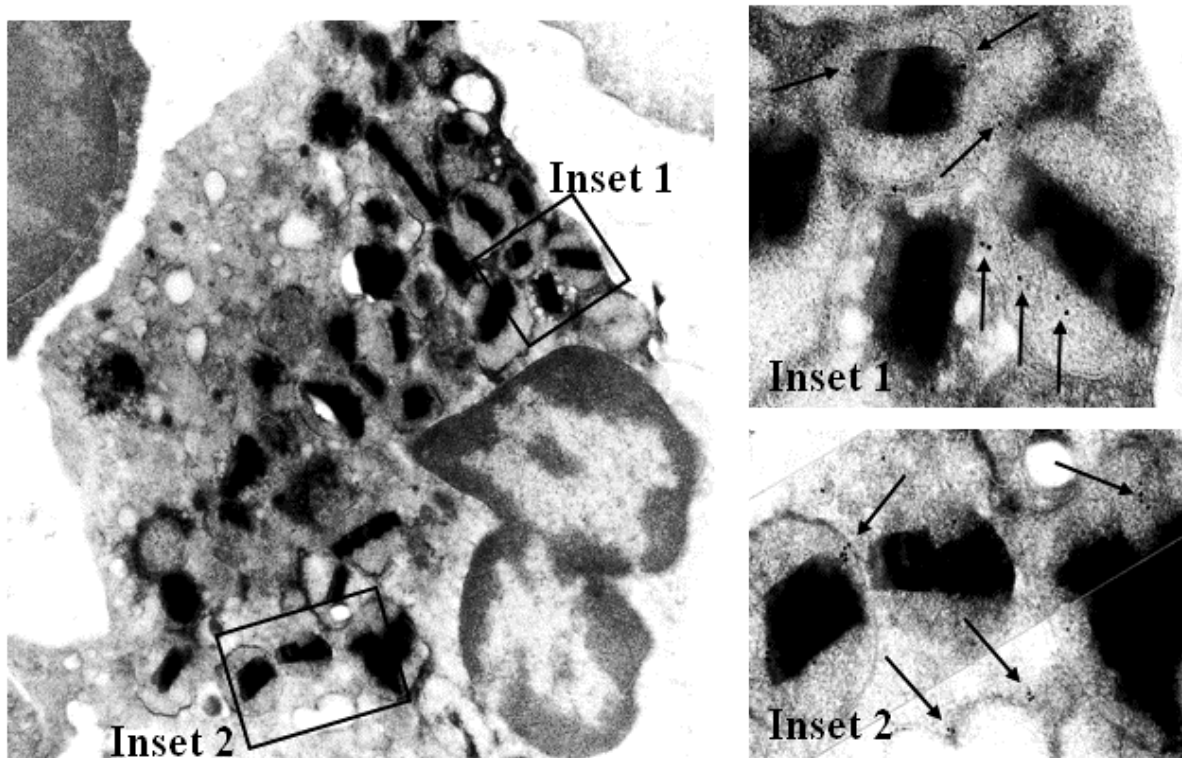


Abb. 13: Analyse der Anwesenheit von präformiertem TF in reifen eosinophilen Granulozyten im peripheren Blut. In den spezifischen Granula mit kristalloidem Kern erkennt man deutlich die zahlreichen Goldkörner (Pfeile). Inset 1 und 2 zeigen vergrößerte Ausschnitte.

Eosinophile Granulozyten sind also die einzigen Zellen der myelozytären Reihe, bei denen mittels Immun-Elektronenmikroskopie nennenswerte Mengen an präformiertem TF nachgewiesen werden können.

Der nächste Schritt bestand nun darin, den TF-Gehalt der Eosinophilen zu quantifizieren. Dazu wurde ein Double-Sandwich-ELISA, der spezifisch *full-length* TF erkennt, mit isolierten Zellen durchgeführt. Die durch mehrere Tau-Gefrier-Zyklen aufgeschlossenen Proben wurden zuerst an den am Reagenzgefäß adhärenen anti-TF-Antikörper VIC7 gebunden, der die Aminosäuren 181-214 der extrazellulären Domäne von TF erkennt. Anschließend wurde ungebundenes Protein entfernt und ein zweiter anti-TF-Antikörper (IID8) zugefügt, der gegen ein anderes Epitop gerichtet ist, und zwar die Aminosäuren 1-25 der extrazellulären Domäne. Dieser zweite Antikörper konnte nun mit einem

peroxidasegekoppelten dritten Antikörper und einem chromogenen Substrat im Photometer quantitativ bestimmt werden.

Es ergab sich für frisch isolierte, unstimulierte Eosinophile ein TF-Gehalt von 280-540 pg/mg Gesamtprotein [Mittelwert \pm S.E.M.] (Tab. 4). Als Negativkontrolle dienten isolierte Neutrophile, die keinen messbaren Gehalt an TF zeigten.

Tabelle 4:

	Neutrophile	Eosinophile
TF [pg/mg Protein \pm S.E.M.]	< Detektionslimit n=3	412 \pm 128 n=5 p<0,0001 im Vergleich zu Neutrophilen

Da bei Thrombozyten ein Wert von ca. 60 pg TF/mg Gesamtprotein ermittelt wurde [Zillmann et al, 2001], enthalten Eosinophile ca. 7x mehr TF pro mg Protein als Thrombozyten und stellen somit überraschenderweise diejenigen Zellen im peripheren Blut dar, die den größten Gehalt an präformierten TF haben.

3. Aktivierung von isolierten Eosinophilen durch GMCSF/PAF

Anschließend wurde analysiert, inwieweit die Konzentration des eosinophilen TF durch Aktivierung der Zellen reguliert wird. Dazu wurden die Eosinophilen mit einem zellspezifischen Stimulus stimuliert.

Zunächst erfolgte eine Voraktivierung mit GMCSF (Endkonzentration von 50 ng/ml) für 20 Min., gefolgt von einer Aktivierung mit PAF (Endkonzentration von 10 μ M) für 25 min.

Um die Effizienz der Stimulation zu dokumentieren, wurde die ECP-Konzentration im Überstand von unstimulierten und stimulierten Eosinophilen mit einem Fluoreszenz-Enzym-Immuno-Essay bestimmt. ECP befindet sich zusammen mit anderen Proteinen in den spezifischen Granula und kommt nahezu ausschließlich in eosinophilen Granulozyten vor. Bei der Aktivierung der Zellen kommt es zur Degranulation der spezifischen Granula und die in den Granula befindlichen Proteine wie ECP werden somit ins umgebende Medium abgegeben. Daher eignet sich die Bestimmung von ECP im extrazellulären Medium als spezifisches Maß für den Aktivierungsstatus von eosinophilen Granulozyten [Egesten, 2001].

Nach Priming mit GMCSF konnte ein Anstieg in der ECP-Konzentration der Probe gemessen werden; dieser Wert stieg durch die Stimulation mit PAF noch deutlich weiter an (Abb. 14). Dies zeigt, dass die verwendete Stimulierung tatsächlich zu einer Aktivierung der Zellen führt.

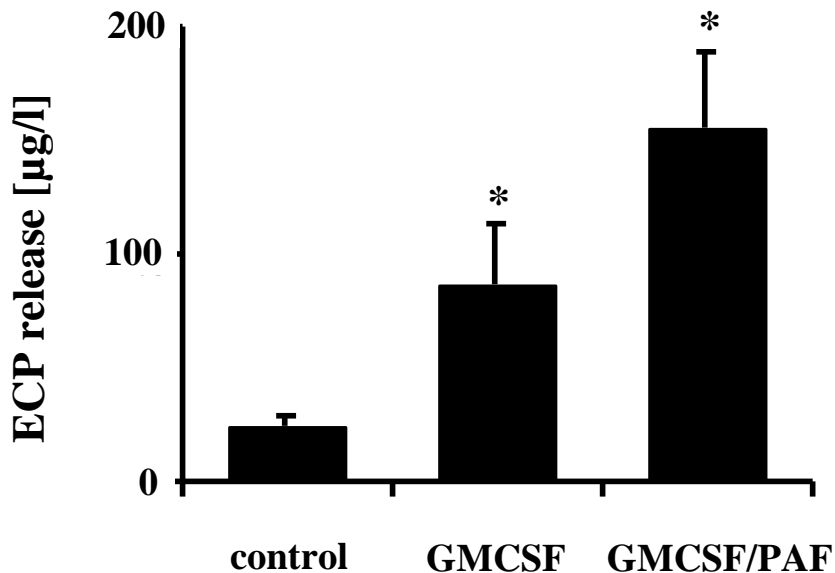


Abb. 14: Nachweis der Degranulation von Eosinophilen durch ECP-Messung
 Im Überstand aktivierter Eosinophiler wurde ECP gemessen,
 Mittelwerte: Control 24,4 ± 5,2; GMCSF 50ng/ml 86,3 ± 26,3;
 GMCSF/PAF 156,0 ± 31,9 [µg/l ± S.E.M.]
 n=4 , * p< 0,05 im Vergleich zur Kontrolle

4. Aktivierung der TF-Synthese in isolierten Eosinophilen durch Stimulation mit GMCSF/PAF

Um herauszufinden ob Eosinophile zur *de novo* Synthese von TF fähig sind, wurde geprüft ob TF-mRNA in isolierten Eosinophilen nachweisbar ist.

Als Positivkontrolle dienten dabei LPS-stimulierte Monozyten, die bekanntermaßen TF neu synthetisieren können und auch erhebliche Mengen an TF-mRNA enthalten. Weiterhin wurden Thrombozyten, die ebenfalls TF enthalten, analysiert. Zum Ausschluß von falsch positiven Ergebnissen wurden auch Lymphozyten untersucht, die in den isolierten Eosinophilen als Verunreinigung vorkommen können.

Tatsächlich fand sich in isolierten ruhenden Eosinophilen ein Transkript der erwarteten Größe von 275 Basenpaaren, das in der Gelelektrophorese exakt auf Höhe der Positivkontrolle lief

(Abb. 15). Durch die Quantifizierung der TF-mRNA mittels real-time-PCR ergab sich für unstimulierte Eosinophile etwa ein Wert von 10 % der Positivkontrolle. Durch die zellspezifische Stimulation mit GMCSF und PAF zeigte sich ein deutlicher Anstieg der TF-mRNA auf ca. ein Drittel der Positivkontrolle (Abb. 15). In ruhenden Plättchen oder in isolierten Lymphozyten (PBL) war kein entsprechendes Transkript nachweisbar.

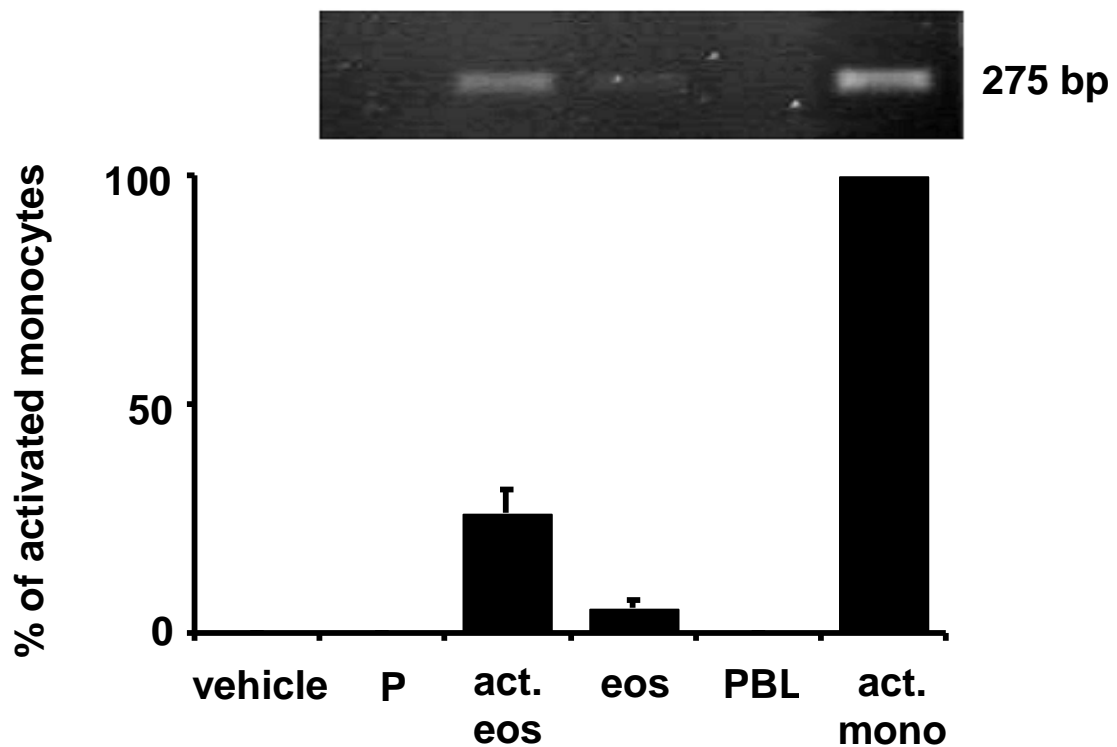


Abb. 15: TF-mRNA in verschiedenen Zellen des Blutes (*vehicle*: Negativkontrolle; *P*: Plättchen; *act. eos*: aktivierte Eosinophile; *eos*: ruhende Eosinophile; *PBL*: Lymphozyten; *act. mono*: Positivkontrolle). Oben ein Ausschnitt aus einem Elektrophorese-Gel nach konventioneller RT-PCR, unten die Quantifizierung der Transkript-Menge durch real-time PCR. n=3

Um zu prüfen, ob es durch die Aktivierung der Transkription des TF-Gens zu einer vermehrten Synthese des TF-Proteins kommt, wurden gleichzeitig stimulierte und unstimulierte Eosinophile im Double-Sandwich-ELISA auf das Vorhandensein von TF untersucht.

In allen Ansätzen zeigte sich tendenziell eine Zunahme des TF-Proteins nach Stimulierung der Eosinophilen mit GMCSF/PAF (Tab. 5). Da deutliche Unterschiede im TF-Gehalt zwischen Isolaten von verschiedenen Spendern beobachtet wurden, war der Anstieg statistisch nicht signifikant.

Tabelle 5:

	Eosinophile	Eosinophile nach Stimulation mit GMCSF/PAF
TF [pg/mg Protein ± S.E.M.]	412 ± 128 n=5	539 ± 106 n=5

5. TF-Präsentation auf der Oberfläche von isolierten Eosinophilen

Nachdem die Anwesenheit von TF in eosinophilen Granulozyten durch verschiedene Methoden nachgewiesen werden konnte, wurde nun untersucht, ob der Eosinophilen-TF durch die zellspezifische Stimulation mit GMCSF und PAF auf der Oberfläche präsentiert wird.

Bei der Degranulation von eosinophilen Granulozyten gelangen die in den Granula befindlichen Proteine durch die Fusion der Granula-Membranen mit der Zellmembran auf die Zelloberfläche. Als membrangebundenes Protein sollte der in den Zellen vorhandene TF nach der Stimulation durch extrazelluläre TF-spezifische Antikörper vermehrt auf der Zelloberfläche nachweisbar sein.

Die Präsentation von TF-Antigen auf der Oberfläche von Eosinophilen wurde mittels Flowzytometrie untersucht. Abb. 16 zeigt ein typisches Experiment. Es wurde ein Gate um die isolierten Eosinophilen gelegt und pro Ansatz jeweils 10000 Zellen in diesem Gate ausgezählt. Anschließend wurden die TF-positiven Zellen mit dem festgelegten Gate in den stimulierten Proben gemessen (Abb. 16).

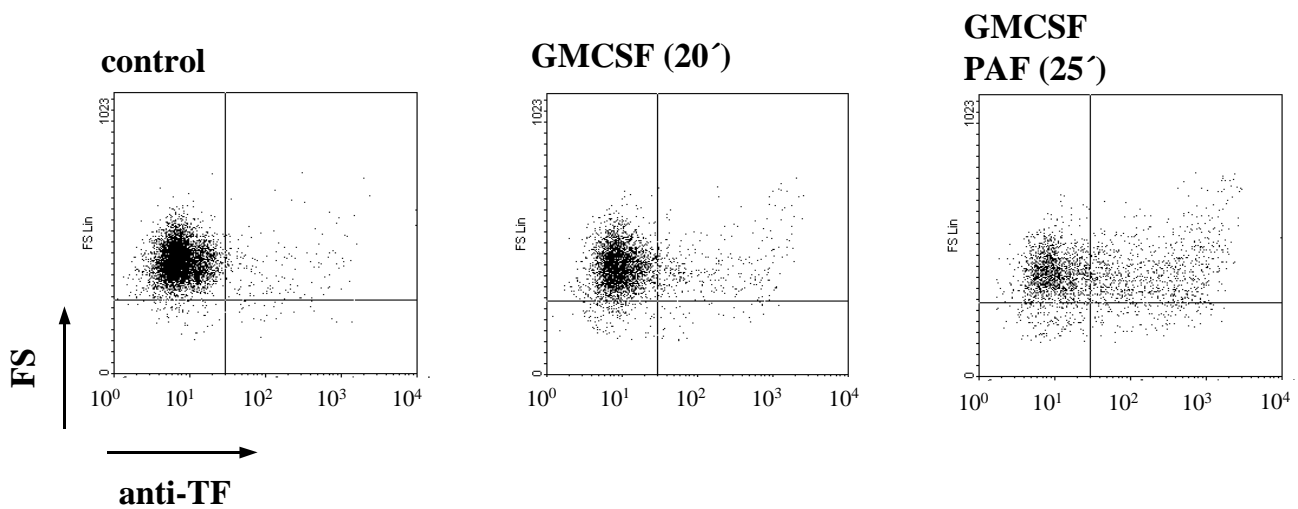


Abb. 16: Nachweis von TF auf der Zelloberfläche aktivierter Eosinophiler mittels Flowzytometrie.

Eosinophile wurden mit FITC-markiertem anti-TF-Antikörper inkubiert. Ohne Stimulation zeigen sich nur wenige Zellen mit Fluoreszenz (rechter oberer Quadrant), nach Stimulierung ergibt sich ein deutlicher Anstieg der FITC-markierten Zellen, als Nachweis einer zunehmenden Präsentation von TF auf der Oberfläche durch Aktivierung.

Repräsentatives Experiment von insgesamt 4 Experimenten

Bereits nach Priming mit GMSCF nahm die Zahl der TF-positiven Zellen von $2,3 \pm 1 \%$ auf $10 \pm 3 \%$ zu. Durch Stimulation mit GMCSF und PAF stieg der Anteil der TF-positiven Zellen auf $26,1 \pm 6 \%$ (Abb. 17).

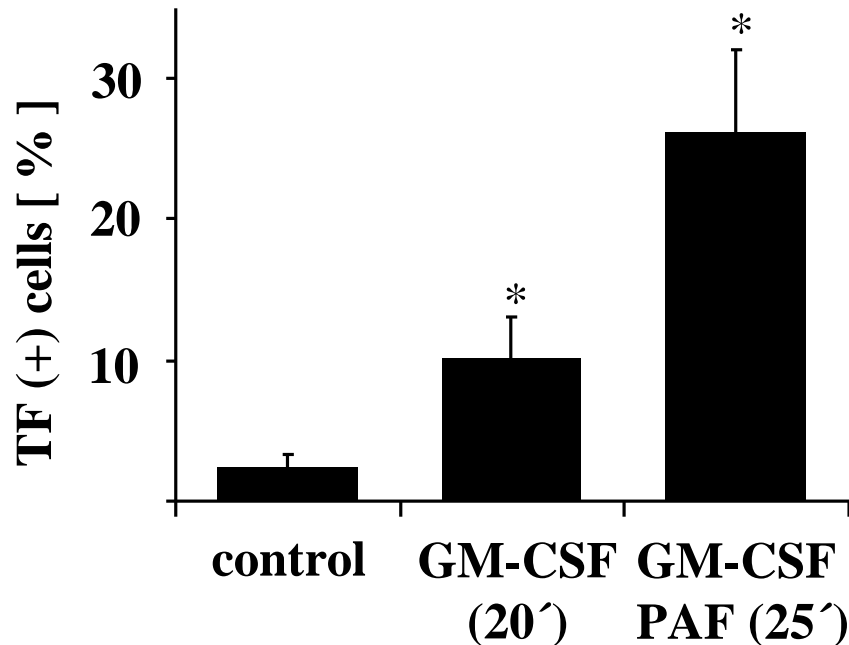


Abb. 17: Präsentation von TF auf der Oberfläche von aktivierten Eosinophilen
Isolierte Eosinophile wurden mit einem FITC-markierten anti-TF-Antikörper inkubiert. Bestimmt wurde die Zahl der TF-positiven Zellen mittels Flowzytometrie.

Mittelwerte:

Control $2,3 \pm 1$; GMCSF 10 ± 3 ; GMCSF/PAF $26,1 \pm 6$ [% \pm S.E.M.]

n=4, * p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle

Um die Präsentation von TF auf der Oberfläche mit einer unabhängigen Methode nachzuprüfen, wurden parallel zu den Flowzytometrie-Experimenten Schnitte von stimulierten Eosinophilen im Elektronenmikroskop untersucht. Die Zellen wurden sofort nach der Stimulation mit Fixationslösung fixiert, in Acryl eingebettet und entsprechend den bisherigen Versuchen mit anti-TF-Antikörpern und goldmarkierten Antikörpern eingefärbt. Im Gegensatz zu den unstimulierten Eosinophilen zeigten sich die Goldkörner bei stimulierten Zellen nicht ausschließlich intrazellulär in den Granula, sondern auch deutlich sichtbar auf der extrazellulären Oberfläche der Zellmembran (Abb. 18). Diese Ergebnisse belegen, dass der in den Zellen vorhandene TF durch Stimulation auf der Oberfläche der Eosinophilen präsentiert wird.

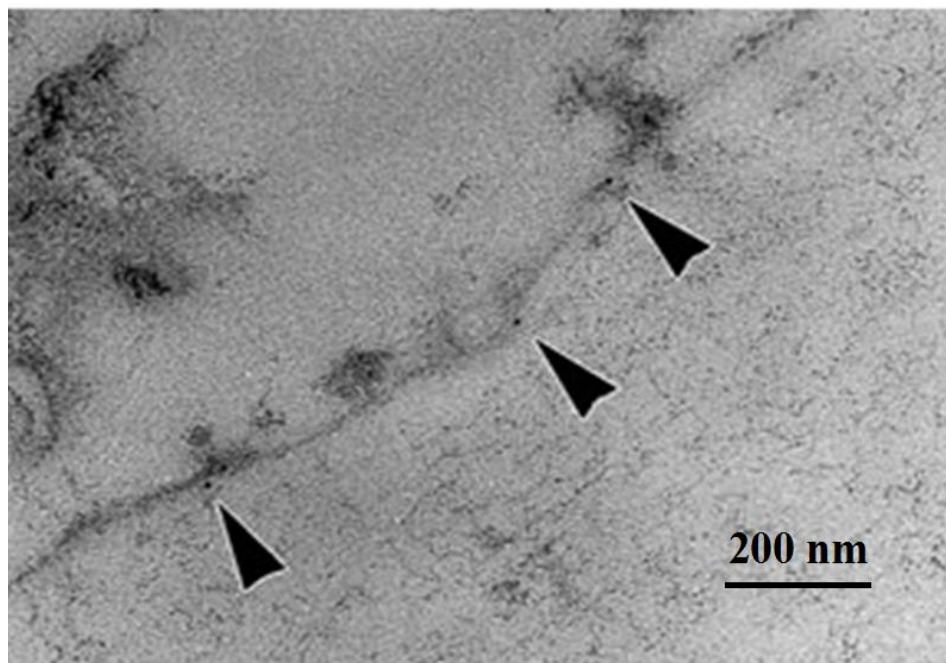
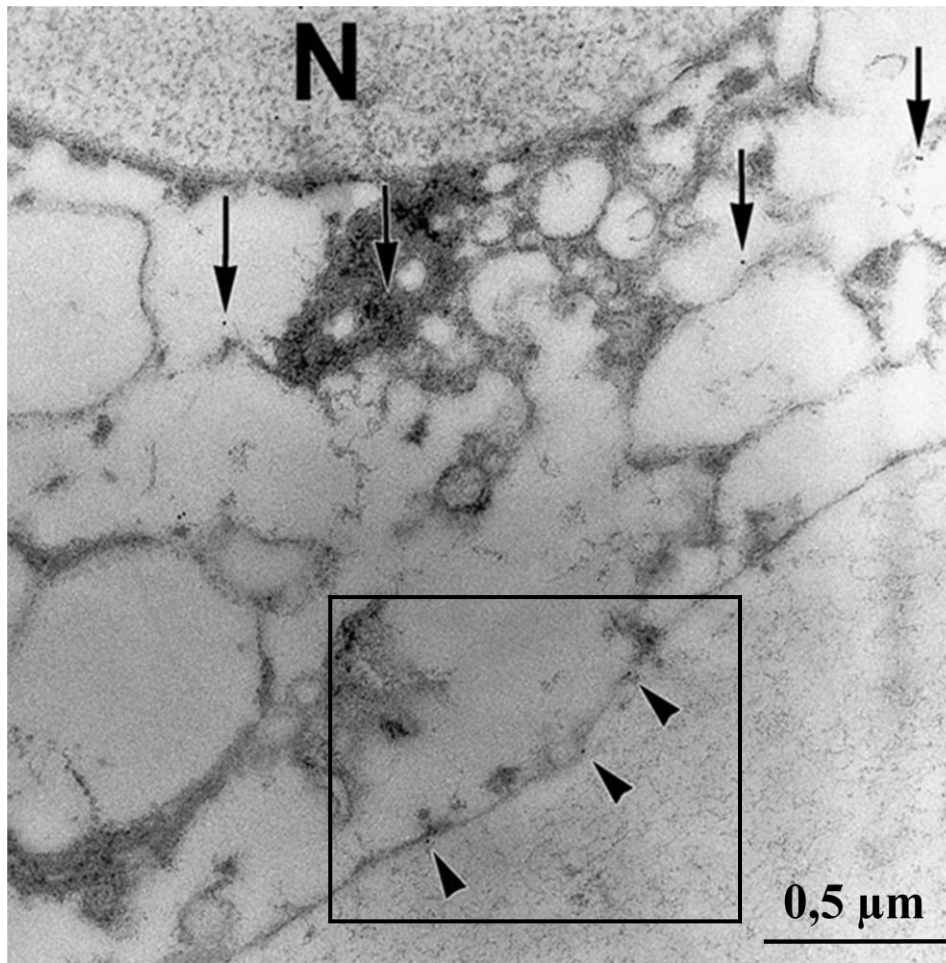


Abb. 18: Präsentation von TF auf der Oberfläche von aktivierten Eosinophilen im Elektronenmikroskop. Die Pfeile weisen auf die Goldkörner im intrazellulären Kompartiment, die Pfeilköpfe zeigen Goldkörner auf der Zelloberfläche an. Die untere Abbildung zeigt den markierten Ausschnitt aus der oberen Abbildung.

6. Funktionelle Aktivität des Eosinophilen-TF

Als nächstes stellt sich nun die Frage, ob der auf der Oberfläche von Eosinophilen präsentierte TF auch funktionell aktiv ist. Dazu wurden Versuche mit einem TF-Aktivitäts-Assay durchgeführt. In Anwesenheit von TF wird Faktor X zu Faktor Xa aktiviert. Der entstandene Faktor Xa kann ein chromogenes Substrat spalten; die dabei beobachtete Zunahme der Gelbfärbung wird photometrisch gemessen. Die Intensität des entstandenen Farbstoffumschlags ist dabei proportional zu der in der Probe vorhandenen TF-Aktivität.

Die isolierten, intakten Eosinophilen wurden unstimuliert und nach einer Stimulation mit GMCSF und PAF untersucht. In diesen Experimenten zeigte sich keine nennenswerte TF-Aktivität der intakten Eosinophilen – weder vor noch nach der Stimulation. Als Positivkontrolle wurden LPS-stimulierte Monozyten verwendet (Abb. 19).

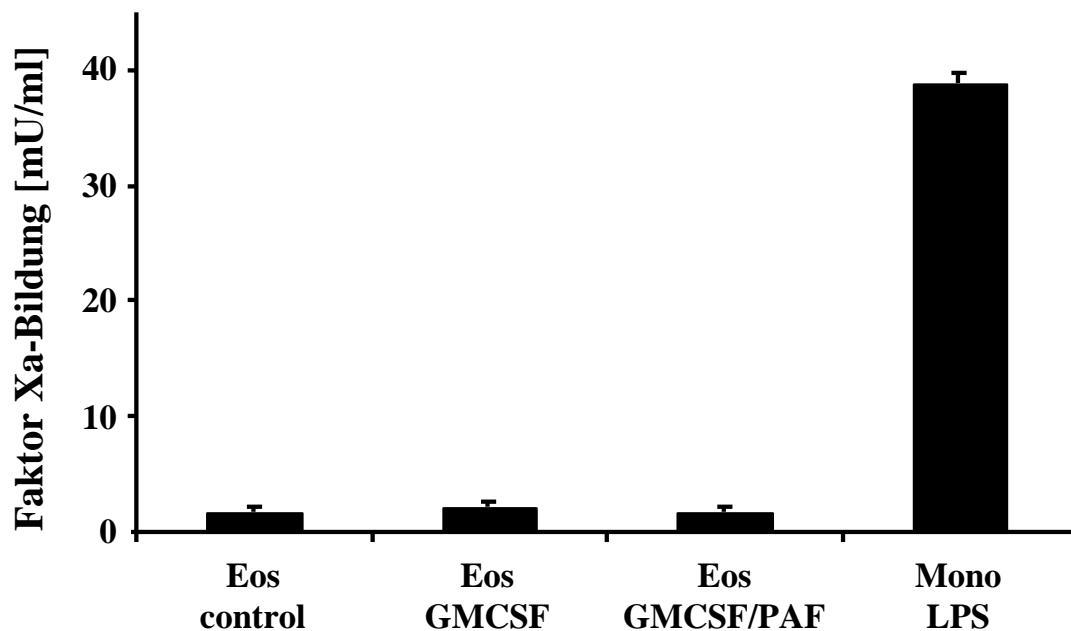


Abb. 19: TF-Aktivität intakter Eosinophiler (Faktor Xa-Bildung).

Eos control: Unstimulierte Eosinophile; *Eos GMCSF*: Stimulation mit GMCSF; *Eos GMCSF/PAF*: Stimulation mit GMCSF und PAF; *Mono LPS*: LPS-stimulierte Monozyten als Positivkontrolle

Mittelwerte: Eos control $1,78 \pm 0,44$; Eos GMCSF $2,12 \pm 0,45$; Eos GMCSF/PAF $1,83 \pm 0,32$; Mono LPS $38,9 \pm 0,90$ [mU/ml \pm S.E.M]; n=9

Da intakte Eosinophile keine TF-Aktivität aufweisen, wurde als nächstes analysiert ob dies in lysierten Zellen der Fall war. Bekannterweise induziert Zell-Lyse eine TF-Aktivierung [Drake, 1989]. In diesen Experimenten konnte in der Tat TF-Aktivität in eosinophilen Granulozyten nachgewiesen werden.

Die detektierte TF-Aktivität betrug ca. 1/3 der Positivkontrolle mit LPS-stimulierten Monozyten. Durch einen anti-TF-Antikörper konnte die Aktivität um 80% gehemmt werden, während der Kontroll-Antikörper keinen Effekt zeigte (Abb. 20).

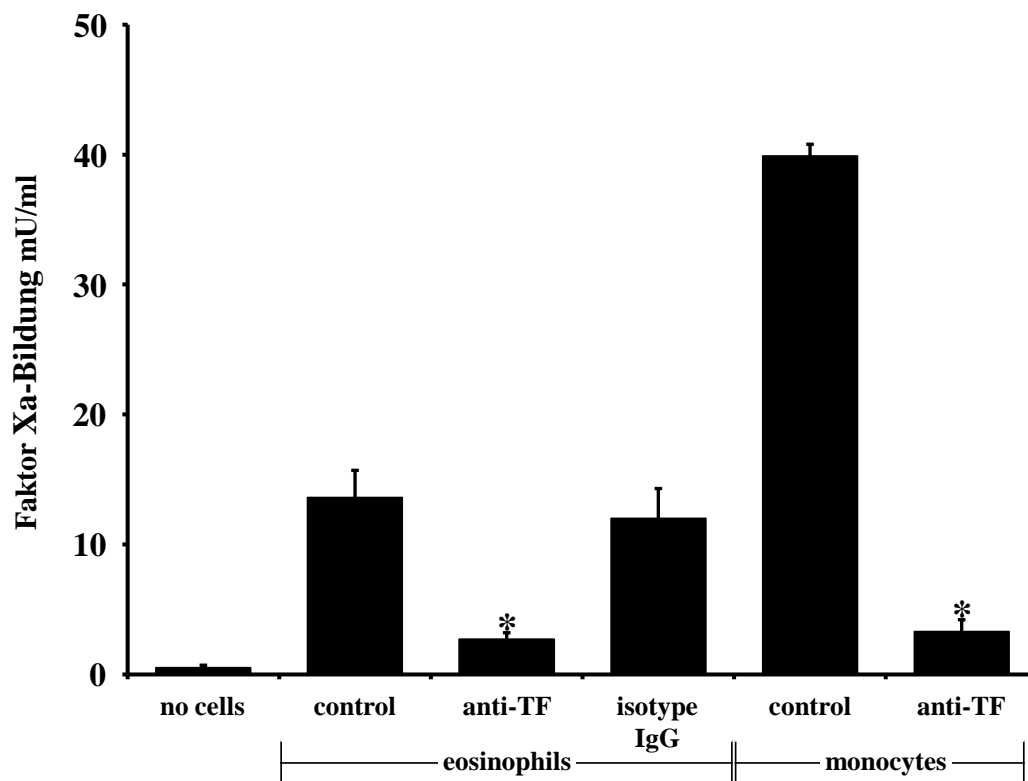


Abb. 20: TF-Aktivität in lysierten Eosinophilen (Faktor Xa-Bildung).

Eosinophils: control: Eosinophile nach Stimulation mit GM-CSF/PAF; *anti-TF:* Vorinkubation mit anti-TF-Antikörper; *isotype IgG:* Vorinkubation mit Isotyp-Antikörper (Kontrolle)

Monocytes: control: LPS-stimulierte Monozyten als Positivkontrolle; *anti-TF:* Vorinkubation mit anti-TF-Antikörper

Mittelwerte:

Eosinophils: control $13,6 \pm 2,1$; anti-TF $2,7 \pm 0,5$; isotype IgG $12 \pm 2,3$;

Monocytes: control $39,9 \pm 0,9$; anti-TF $3,3 \pm 0,9$ [mU/ml ± S.E.M]

n=4, * p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle

Um nicht nur die Aktivität des Eosinophilen-TF alleine sondern auch mögliche Einflüsse anderer Zellen (wie Neutrophiler oder Thrombozyten) auf die Aktivität des Eosinophilen-TF zu untersuchen wurde die Blutgerinnung global in Blutzell-Gemischen mittels Thrombelastographie (TEG) analysiert. Die TEG-Versuche wurden in Anwesenheit von unstimulierten und stimulierten Eosinophilen mit/ohne Neutrophile in plättchenreichem Plasma (PRP) durchgeführt. Dadurch sollte der Einfluß der im Vollblut bereits vorhandenen Eosinophilen minimalisiert werden. Um die Gerinnungsreaktion zu stimulieren, wurden alle Proben kurz vor dem Reaktionsstart mit Kalzium und Collagenreagenz vorstimuliert.

Es ergab sich in den Experimenten in Anwesenheit anderer Blutzellen kein Hinweis auf eine Gerinnungsaktivierung durch Eosinophile (*nicht gezeigt*).

7. Anti-TF hemmt die Transmigration von isolierten Eosinophilen durch das Endothel

TF kann neben seiner prokoagulatorischen Aktivität eine Vielfalt weiterer Zellfunktionen vermitteln, so auch die Zell-Migration. Es wurde bereits beschrieben, dass TF für die Retro-Transmigration von Monozyten durch die Endothelschicht von Bedeutung ist [Randolph, 1998]. Auch kann TF die Metastasierung von Karzinomzellen fördern [Mueller BM, 1992], wobei die prokoagulatorische Aktivität von TF keine Rolle zu spielen scheint [Bromberg, 1999]. Deshalb wurde nun die mögliche Bedeutung von Eosinophilen-TF für die transendotheliale Migration der Eosinophilen untersucht. Die Experimente zur Transmigration der Eosinophilen durch das Endothel wurden in Kooperation mit S. Cuvelier (Canada Research Chair in Leukocyte Trafficking, University of Calgary, Canada) durchgeführt.

Weil die Diapedese von Eosinophilen unter anderem auch von der Scherspannung in einem fließenden Medium abhängig ist [Cuvelier, 2001], kam eine Strömungskammer mit parallelen Platten zur Anwendung. In dieser Kammer befand sich parallel zum laminaren Fluß eine konfluente Endothelzellschicht aus HUVECs, die mit IL-4 vorinkubiert wurde. Diese Vorinkubation der HUVECs war notwendig, um durch Expression von VCAM-1 und P-Selektin die Transmigration der Eosinophilen zu ermöglichen.

Die Endothelzellschicht wurde nun bei einer definierten Scherspannung mit einer Suspension von frisch isolierten Eosinophilen überströmt. Die Zahl der transmigrierten Zellen wurde durch Aufnahmen mit einer CCD-Kamera bestimmt. Um die Wirkung von TF auf Rolling,

Adhäsion und Transmigration zu untersuchen, wurden sowohl die HUVECs als auch die isolierten Eosinophilen mit den anti-TF-Antikörpern VIC7 bzw. VD8 vorinkubiert.

Abb. 21 zeigt die Anzahl der auf der Endothelschicht adhärenen Eosinophilen 4-5 Minuten nach Zugabe. 90 % der Eosinophilen waren bereits fest adhären, nur 10 % befanden sich noch im Stadium des Rolling. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der akkumulierten Eosinophilen zwischen der Kontrolle und den mit anti-TF-Antikörper vorinkubierten Ansätzen. Dem TF der Eosinophilen scheint also bei der Kontaktaufnahme der Zellen mit dem Endothel und der festen Adhärenz keine nennenswerte Bedeutung zuzukommen (Abb. 21).

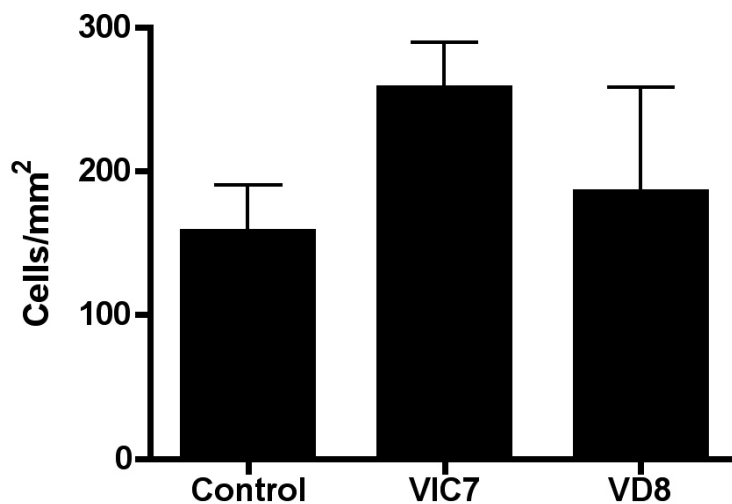


Abb. 21: Akkumulation von Eosinophilen auf dem Endothel nach 4-5 Minuten Perfusion.

90% der Zellen waren zu diesem Zeitpunkt fest adhären.

Control: Vorinkubation des Endothels mit Kontroll-Antikörper

VIC7: Vorinkubation mit dem anti-TF-Antikörper VIC7

VD8: Vorinkubation mit dem anti-TF-Antikörper VD8

Mittelwerte: Control: 161,3 ± 32,3; VIC7: 258,6 ± 33,7; VD8: 185,3 ± 74,0

[cells/mm² ± S.E.M]; n=4

Nachdem die Eosinophilen fest an die mit IL-4 stimulierten HUVECs adhäreren, erfolgt unmittelbar danach die Transmigration der Leukozyten. Die Transmigrationsrate der eosinophilen Granulozyten wurde nach einem Zeitintervall von 3-4 Min. bzw. 6-7 Min. durch die Auswertung der mit der CCD-Kamera aufgenommenen Bilder untersucht. Dabei gilt:

$$\text{Transmigrationsrate} = \text{Anzahl der transmigrierten Zellen} / \text{Anzahl der gesamten Zellen}$$

Es zeigte sich, dass nach 4 Min. Transmigration die Anzahl der migrierten Zellen in den mit anti-TF-Antikörper vorinkubierten Proben im Vergleich zur Kontrolle deutlich verringert war. Es ergab sich eine Reduktion um 70% durch VIC7 und sogar eine Reduktion um 79 % durch VD8 (Abb. 22).

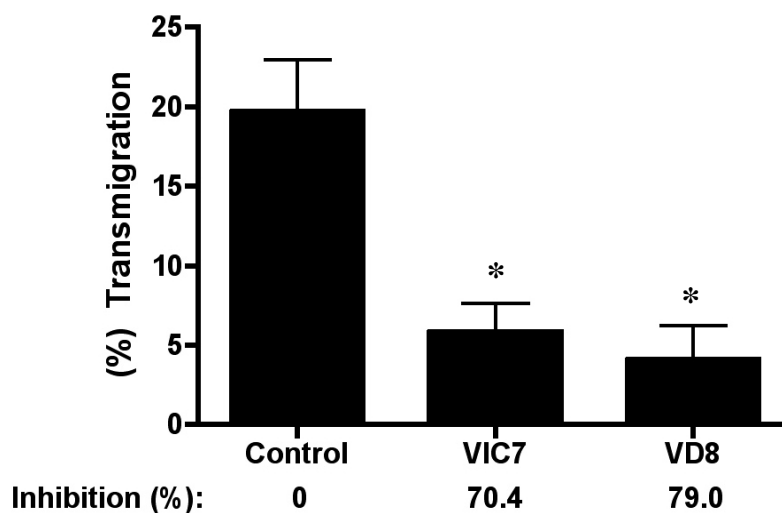


Abb. 22: Reduktion der frühen Transmigration durch anti-TF-Antikörper (3-4 Min. Perfusion)

Control: Vorinkubation des Endothels mit Kontroll-Antikörper

VIC7: Vorinkubation mit dem anti-TF-Antikörper VIC7

VD8: Vorinkubation mit dem anti-TF-Antikörper VD8

Mittelwerte: Control: $19,7 \pm 3,0$; VIC7: $6,0 \pm 1,7$; VD8: $4,3 \pm 1,9$

[Prozent transmigrierter Zellen \pm S.E.M.]

n=3, * p< 0,05 im Vergleich zur Kontrolle

Zu einem späteren Zeitpunkt – nach 7 Min. Transmigration – konnte immer noch eine Verringerung der Transmigration nach Zugabe der anti-TF-Antikörper festgestellt werden; allerdings in einem geringeren Ausmaß. Hier zeigte sich eine Reduktion um 24 % durch VIC7 und eine Reduktion um 32 % durch VD8 (Abb. 23).

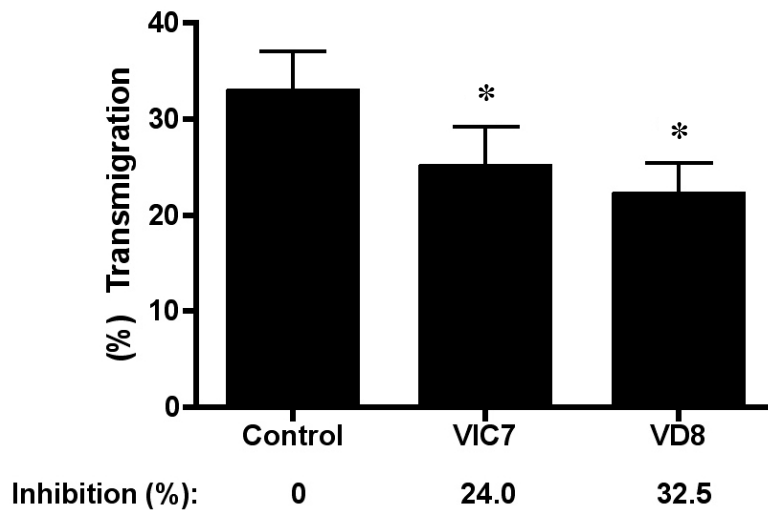


Abb. 23 : Reduktion der Transmigration durch anti-TF-Antikörper (7 Min. Perfusion)

Control: Vorinkubation des Endothels mit Kontroll-Antikörper

VIC7: Vorinkubation mit dem anti-TF-Antikörper VIC7

VD8: Vorinkubation mit dem anti-TF-Antikörper VD8.

Mittelwerte: Control: 33,3 ± 3,7; VIC7: 25,3 ± 3,7; VD8: 22,7 ± 2,7

[Prozent transmigrierter Zellen ± S.E.M.]

n=4 , * p< 0,05 im Vergleich zur Kontrolle

Die Ergebnisse zeigen demnach, dass der Eosinophilen-TF vor allem bei der frühen Transmigration durch das Endothel eine gewichtige Rolle spielen könnte.

V. Diskussion

1. Intravaskulärer TF

In den letzten Jahren wurde die Theorie des *hemostatic envelope* – des rein extravaskulären Vorkommens von TF zur Gerinnungsaktivierung nach Verletzung der Integrität des Gefäßsystems - erweitert: In der Tat wurde zunehmend experimentelle Evidenz dafür gefunden, dass TF auch im Blut selber vorhanden ist (sog. intravaskulärer oder *blood-borne* TF). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass intravaskulärer TF auch alleine eine suffiziente Thrombusbildung initiieren kann [Giesen, 1999]. Unter physiologischen Bedingungen konnte präformierter TF in den α -Granula und im offenen kanalikulären System von Thrombozyten nachgewiesen werden. Plättchen-TF wird nach Kollagenkontakt und Aktivierung der Plättchen auf der Oberfläche präsentiert [Zillmann, 2001]. In Megakaryozyten wurde kein TF nachgewiesen, so dass diese als Quelle des Plättchen-TF offensichtlich nicht in Frage kommen. Ob der präformierte TF in Plättchen durch dort enthaltene TF-mRNA *de novo* synthetisiert [Camera, 2003], oder über TF-positive Mikropartikel aufgenommen wird [Del Conde, 2005] bleibt unklar. Unabhängig von der Herkunft des Plättchen-TF ergibt sich jedoch zusammen mit exponiertem Phosphatidylserin (PS) auf der Oberfläche von aktivierten Plättchen eine „thrombogene Plattform“, die auch nachdem der Kontakt mit dem extravaskulären TF durch eine erste Zellschicht beendet ist zum weiteren Wachstum eines intravasalen Thrombus führen könnte [Engelmann, 2003]. Weiterhin scheinen TF-positive Mikropartikel, die aus aktivierten Plättchen und/oder Leukozyten gebildet werden, das Wachstum eines Thrombus zu verstärken [Müller, 2003].

Untersuchungen *in vivo* im Maus-Modell führten zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der Bedeutung von intravaskulärem und Gefäßwand-TF. Nach Transplantation von Knochenmark aus low-TF- bzw. Wildtyp-Mäusen in Wildtyp- bzw. low-TF-Mäuse erfolgte eine gezielte Gefäßverletzung. Dabei zeigte sich ein normaler TF- und Fibrin-Gehalt in low-TF-Mäusen mit wt-Knochenmark [Chou, 2004], was auf eine entscheidende Bedeutung des intravaskulären TF beim Thrombuswachstum hindeutet. Eine andere Untersuchung mit ähnlichen Methoden kam jedoch zu dem Ergebnis, dass low-TF Mäuse auch durch Transplantation von wt-Knochenmark keine gesteigerte Thrombus-Bildung aufweisen [Day, 2005], was wiederum die Rolle des TF der Gefäßwand hervorhebt. Mittels intravitale Mikroskopie bei Mäusen wurde TF im wachsenden Thrombus an Arteriolen im M. cremaster

hauptsächlich an der Übergangszone zwischen Thrombus und Gefäßwand nachgewiesen [Falati, 2002].

Die unterschiedlichen Ergebnisse sind am ehesten auf die unterschiedlichen angewandten Methoden und Bedingungen zurückzuführen.

Schon 1975 konnte in mit Endotoxin stimulierten Leukozyten-Suspensionen eine *de novo* Synthese von TF nachgewiesen werden, wobei die größte TF-Aktivität in isolierten Monozyten vorgefunden wurde. Die schwache TF-Aktivität in PMN- und Lymphozyten-Suspensionen wurde auf eine Verunreinigung durch Monozyten zurückgeführt [Rivers, 1975]. Der durch Monozyten synthetisierte TF scheint zunächst hauptsächlich bei pathologischen Prozessen eine Rolle zu spielen, z.B. bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit [Leatham, 1995] oder Meningokokken-Sepsis [Østerud, 2001]. Neuere Untersuchungen konnten auch in gesunden Probanden in einem kleinen Teil der Monozyten TF-Antigen nachweisen [Egorina, 2005].

Bisher konnte jedoch im peripheren Blut unter physiologischen Bedingungen kein relevanter präformierter TF in Granulozyten detektiert werden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass eosinophile Granulozyten, eine Subpopulation der Blut-Leukozyten, präformierten TF enthalten. Die Menge des in Eosinophilen detektierten TF übersteigt deutlich den TF-Gehalt in anderen ruhenden Blutzellen, sie enthalten pro mg Zellprotein etwa die 7fache Menge im Vergleich zu Thrombozyten, bzw. etwa ein Viertel des TF-Gehaltes von LPS-stimulierten Monozyten [Reinhardt, 2007].

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wird von anderen Autoren davon ausgegangen, dass Monozyten die einzigen Zellen im peripheren Blut sind, die intravaskulären TF exprimieren [Østerud, 2010]. Eine geringe TF-Aktivität auf aus stimuliertem Vollblut isolierten Neutrophilen wurde auf einen Transfer von monozytärem TF auf Neutrophile erklärt, z.B. durch Transfer von TF-positiven monozytären Mikropartikeln [Egorina, 2008]. Eine andere Möglichkeit wäre eine Kontamination der Neutrophilen durch eosinophile Granulozyten, was bei einer Granulozyten-Präparation über Dichtegradienten oder magnetische Säulen bisher billigend in Kauf genommen wurde. Unsere Ergebnisse zeigen jedenfalls, dass in reinen Neutrophilen-Präparationen (nach Entfernung der Eosinophilen durch Negativ-Selektion) mittels Double-Sandwich-ELISA kein TF detektierbar ist (Tab. 4).

Weiterhin gelang es den erwähnten Autoren nicht, TF in eosinophilen Granulozyten nachzuweisen [Sovershaev, 2008]. Unsere Untersuchungsergebnisse lassen sich laut Sovershaev am ehesten auf eine Monozyten-Kontamination oder eine Kontamination mit TF-

positiven Mikropartikeln während der Eosinophilen-Isolation zurückführen. Dagegen spricht der Nachweis von TF-Antigen in Eosinophilen im direkt nach Gewinnung fixiertem Vollblut im Elektronenmikroskop; auch der Nachweis von TF-Antigen in den spezifischen Granula der Eosinophilen macht eine Kontamination unwahrscheinlich. Ein weiterer Kritikpunkt war die Verwendung von nur einem TF-spezifischen Antikörper (VD8) in der Elektronenmikroskopie. In früheren Untersuchungen bei Plättchen erzielten wir jedoch mit verschiedenen Antikörpern (VD8 und VIC7) identische Ergebnisse [Müller I, 2003], so dass von einem sicheren TF-Nachweis durch diese Antikörper auszugehen ist.

Darüber hinaus konnten unsere Ergebnisse in der Zwischenzeit durch immunhistochemische Untersuchungen der Haut von Patienten mit chronischer Urtikaria bestätigt werden. In Doppel-Färbungen mit Antikörpern gegen TF und ECP zeigte sich eindeutig eine Ko-Lokalisation der beiden Proteine [Cugno, 2009]. Da ECP ein Eosinophilen-spezifisches Protein in den spezifischen Granula ist und in keiner anderen Zelle exprimiert wird ist somit vom Vorhandensein von TF in den Eosinophilen der Haut auszugehen. Ein ähnliches Ergebnis lieferten Untersuchungen der Haut von Patienten mit bullösem Pemphigoid [Marzano, 2009a].

2. Ursprung des Eosinophilen-TF – de novo Synthese?

Im Knochenmark konnten wir in allen untersuchten Zellreihen (neutrophile, eosinophile, basophile Granulopoese) TF in unterschiedlicher Menge nachweisen. Im peripheren Blut allerdings zeigen eosinophile Granulozyten weiterhin einen hohen TF-Gehalt, während in den reifen Neutrophilen in Untersuchungen mit einem Double-Sandwich-ELISA kein TF vorhanden war. Die Neutrophilen scheinen also im Verlauf ihrer Entwicklung TF zu verlieren. Andererseits wurde in Megakaryozyten im Knochenmark kein TF detektiert, jedoch in Thrombozyten nachgewiesen [Müller I, 2003]. Dies erklärt sich möglicherweise durch einen Transfer von TF über TF-positive Mikropartikel in Thrombozyten. In neueren Publikationen wurde dies auch für Neutrophile postuliert, nachdem unter bestimmten Bedingungen geringe Mengen TF nachgewiesen wurden [Egorina, 2008].

Dieser Mechanismus kommt prinzipiell auch für den in eosinophilen Granulozyten vorkommenden TF in Frage, jedoch liegt auch die Annahme einer *de novo*-Synthese durch die Eosinophilen selber nahe. Durch die rasche Fixierung von Vollblut nach der Entnahme für die Untersuchungen mit dem Elektronenmikroskop kann eine vorzeitige Aktivierung und eine eventuell dadurch induzierte Synthese von TF ausgeschlossen werden, so dass der

Eosinophilen-TF – im Gegensatz zum monozytären TF, der erst durch Stimulation z.B. mit LPS gebildet wird – physiologischerweise in den im Organismus zirkulierenden Eosinophilen vorzuliegen scheint.

Der größte Teil des Eosinophilen-TF liegt wohl präformiert in den Zellen vor. Ob die Eosinophilen diesen nun von den Vorläuferzellen im Knochenmark übernehmen, diesen konstitutionell synthetisieren oder über TF-positive Mikropartikel aufnehmen wurde bisher nicht ausführlich untersucht. Unsere Ergebnisse legen nichtsdestotrotz nahe, dass eine TF-*de novo*-Synthese in eosinophilen Granulozyten möglich ist. Für eine konstitutionelle Synthese könnte sprechen, dass wir bereits in ruhenden Eosinophilen TF-mRNA nachweisen konnten. Jedoch wurden diese Untersuchungen an isolierten Eosinophilen durchgeführt, so dass während der relativ zeitaufwändigen Isolation möglicherweise eine Aktivierung der Zellen und somit eine Induktion des TF-Gens stattgefunden hat. Nach Stimulation mit GMSCF und PAF stieg die Menge an Transkript auf das 4-5fache an, was eine Induktion des TF-Gens durch Aktivierung belegt. Dies zeigte sich auch auf Protein-Ebene, wobei der Anstieg hier weniger deutlich ausfiel.

Allerdings muss hierbei berücksichtigt werden, dass in gesunden Menschen die eosinophilen Granulozyten nur einen sehr geringen Teil der Leukozyten im peripheren Blut ausmachen (2-4%), was die Frage nach der Bedeutung des Eosinophilen-TF im Blut aufwirft.

3. Präsentation von Eosinophilen-TF nach Aktivierung

In der Elektronenmikroskopie zeigte sich, dass sich TF in ruhenden Eosinophilen vor allem in den spezifischen Granula befindet, die bei der Aktivierung der Zellen (z. B. mit GMCSF und PAF) mit der Zellmembran verschmelzen. Diese Verschmelzung führt zur Präsentation von intragranulären Proteinen auf der Zelloberfläche. Wir konnten mit Hilfe der Flowzytometrie eine deutlich erhöhte TF-Aktivität auf der Oberfläche von aktivierten eosinophilen Granulozyten nachweisen. Sowohl die im Elektronenmikroskop als auch die in der Flowzytometrie erzielten Ergebnisse sprechen für eine Präsentation des in eosinophilen Granulozyten enthaltenen TF nach Stimulation.

4. TF auf Eosinophilen– prokoagulatorische Aktivität

In Versuchen mit intakten Eosinophilen zeigte sich nur eine sehr geringe prokoagulatorische Aktivität des Oberflächen-TF. Die Diskrepanz zwischen dem Vorhandensein von TF und der gemessenen prokoagulatorischen Aktivität wurde schon mehrfach beschrieben [Walsh, 1991]. Man geht von einer funktionellen Inaktivität des vorhandenen TF aus, dieser ist sozusagen „verborgen“. In der Literatur wird dieses Phänomen als *encryption* bezeichnet, die Aktivierung der prokoagulatorischen Aktivität entsprechend als *decryption* [Eilertsen, 2004]. Der Mechanismus dieses Vorgangs ist noch nicht bis ins Detail geklärt. Eine Hypothese geht von einer Dimer-Bildung des TF-Proteins aus, die durch Lokalisation in einem *lipid raft* begünstigt wird [Bach, 2006]. Eine andere Hypothese erklärt die Inaktivierung der prokoagulatorischen Aktivität durch eine allosterische Veränderung eines extrazellulären Cysteinopaars von TF [Chen, 2006].

Unsere Gruppe konnte zeigen, dass der funktionell inaktive (*encrypted*) TF durch die Oxidoreduktase PDI aktiviert wird. Unter physiologischen Bedingungen besteht am Cis209 der extrazellulären Domäne von TF eine Glutathionylierung, wodurch die prokoagulatorische Aktivität unterdrückt wird. Erst durch Abspaltung des Glutathions und Bildung einer Disulfid-Brücke zwischen Cys186/Cis209 durch PDI, die z.B. aus aktivierten Plättchen freigesetzt wird, wird TF funktionell aktiv (*decryption*) [Reinhardt, 2008].

Die prokoagulatorische Aktivität von *encrypted* TF kann durch verschiedene Methoden induziert werden, so z.B. durch Freisetzungserzeugnisse aktivierter Plättchen [Reinhardt 2007], Calcium-Ionophor [Bach, 2006] oder Zell-Lyse [Drake, 1989].

Die prokoagulatorische Aktivität von TF in eosinophilen Granulozyten wurde durch Zell-Lyse gesteigert. Möglicherweise kommt es daher erst nach *decryption* des TF zu einer signifikanten prokoagulatorischen Aktivität von Eosinophilen. Bei Patienten mit bullösem Pemphigoid, wo in der Haut eine Ko-Lokalisation von ECP und TF nachgewiesen wurde, fanden sich in der Blasenflüssigkeit erhöhte Werte für Fibrinfragmente und D-Dimere [Marzano, 2009b]. Dies könnte auf eine Aktivierung des Eosinophilen-TF mit konsekutiver Fibrinbildung hindeuten. Eine Aktivierung der Gerinnung innerhalb des Gewebes könnte über die Bildung von Thrombin auch zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion führen.

Andererseits könnten auch gerinnungsunabhängige Funktionen des TF eine Bedeutung haben. So bleibt z.B. im Falle des *encrypted* TF die Signaltransduktion via PAR2 intakt [Ahamed, 2006].

5. TF auf Eosinophilen - Transmigration

Im Organismus befindet sich der Großteil der eosinophilen Granulozyten im Gewebe. Insofern kommt der Transmigration der Eosinophilen durch das Endothel – die „Auswanderung“ aus dem Gefäßsystem – eine besondere Bedeutung zu.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Eosinophilen-TF eine wichtige Rolle bei der Transmigration der Eosinophilen durch aktiviertes Endothel spielt. Insbesondere fanden wir, dass die frühe Phase der Transmigration der Eosinophilen durch das Endothel über TF vermittelt wird. Eine Reihe früherer Arbeiten an anderen Zellen belegen bereits, dass TF einen Vermittler der Zellmigration darstellen kann:

In Versuchen mit LPS-stimulierten Monozyten konnte durch anti-TF-Antikörper die Transmigration durch das Endothel deutlich reduziert werden. Weiterhin wurde die Adhärenz von Endothelzellen an TF-gecoatete Oberflächen durch Zugabe von anti-TF-Antikörper inhibiert – was für das Vorliegen von TF-Rezeptoren auf Endothelzellen spricht [Randolph, 1998]. Eine direkte Bindung der extrazellulären Domäne von leukozytärem TF an membranständige Proteine auf Endothelzellen ist denkbar. In Blasenkarzinom-Zellen konnte eine Bindung von TF-VIIa auf der Außenseite der Tumorzelle mit immobilisiertem TFPI nachgewiesen werden, gefolgt von einer Zellmigration [Fischer, 1999]. TF-Antigen wurde in Aktin-reichen Membranarealen detektiert [Müller M, 1999], weiterhin zeigte sich eine direkte Interaktion der zytoplasmatischen Domäne von TF mit einem Bestandteil des Zytoskeletts (*actin-binding protein 280*), was auf eine direkte Signaltransduktion mit konsekutiver Veränderung des Zytoskeletts hindeuten könnte (Abb. 24-3) [Ott, 1998].

Die Aktivierung von PAR2 (z.B. durch TF-VIIa) führt über Phosphorylierung des C-Terminus von PAR2 durch die Proteinkinase C und mehrere Zwischenschritte zu einer Gruppierung von Aktin und damit zur Zellmigration (Abb. 24-2)[Ge, 2003].

Dorfleitner et al. zeigten eine Abhängigkeit zwischen der $\alpha 3\beta 1$ -Integrin-abhängigen Migration von CHO-Zellen und dem Phosphorylierungszustand der zytoplasmatischen Domäne von TF. Im unphosphorylierten Zustand wurde die Migration unterdrückt, im phosphorylierten Zustand fand eine Zell-Migration statt [Dorfleitner, 2004]. Betrachtet man nun die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von TF nach Spaltung von PAR2 durch Proteinkinase C (z.B. durch Aktivierung von PAR2 über den TF-VIIa-Komplex), so ergibt sich eine mögliche Hypothese zum promigratorischen Effekt des TF-VIIa-PAR2 Signalweges [Versteeg, 2008b].

Die Transmigration von eosinophilen Granulozyten wird durch verschiedene Rezeptorgruppen vermittelt. Initial erfolgt eine Kontaktaufnahme (*rolling*) mit dem Endothel über Selektine (z.B. P-Selektin), die an Liganden auf der Oberfläche des Eosinophilen binden (z.B. PSGL1). Darauf folgt eine feste Adhäsion (*adhesion*) und die Aktivierung des Eosinophilen. Der Durchtritt durch das Endothel (*transmigration*) wird dann durch Integrine vermittelt (z.B. das Eosinophilen-spezifische *very late antigen* (VLA)-4, ein β 1-Integrin, das an VCAM1 auf der Endothelzelle bindet) [Rosenberg, 2007].

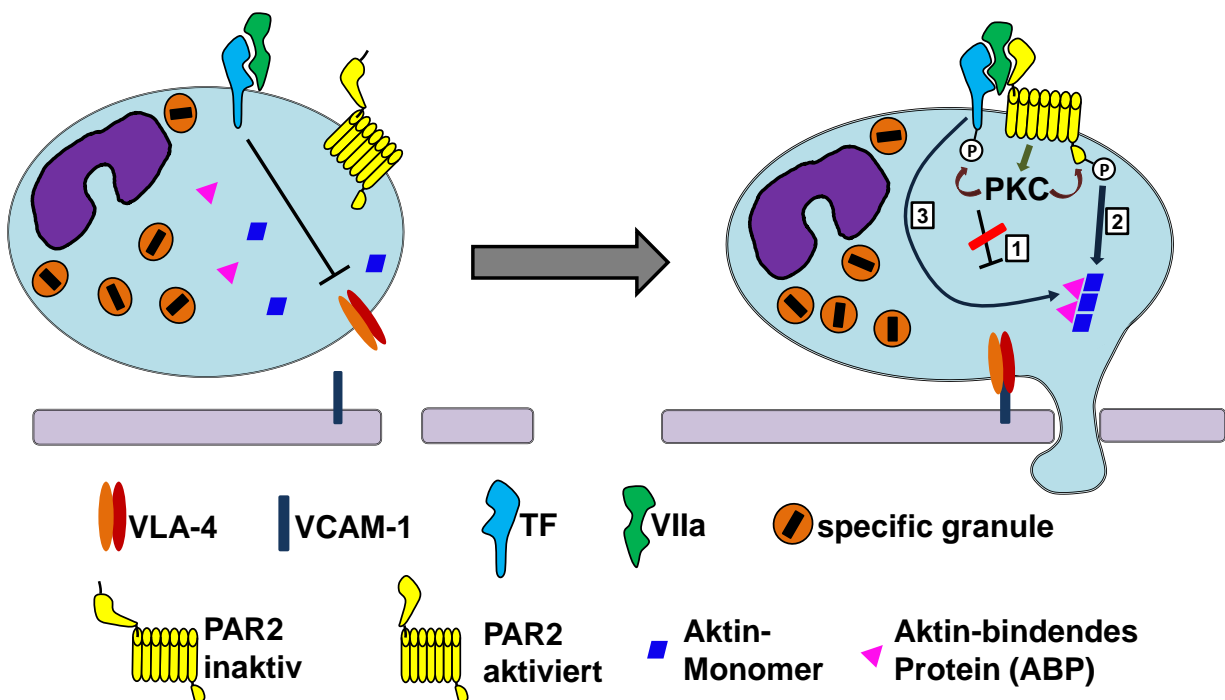


Abb. 24: Hypothesen zur Funktion des TF auf eosinophilen Granulozyten für deren Transmigration durch das Endothel

1. Der Eosinophilen-TF wirkt inhibitorisch auf β 1-Integrine (hier: das Eosinophilen-spezifische VLA-4). Durch Bindung von PAR2 an TF-VIIa kommt es zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und in Folge davon zur Phosphorylierung der zytosomatischen Domäne von TF. Damit wird die Hemmung aufgehoben. VLA-4 kann an endotheliales VCAM-1 binden und es kommt zum Start der Transmigration (nach Dorfleitner, 2004).
2. Durch Phosphorylierung des PAR2 mittels PKC wird über mehrere Zwischenschritte die Polymerisierung von Aktin induziert (nach Ge, 2003).
3. Direkte Interaktion zwischen der zytosomatischen Domäne von TF und Aktin-bindenden Proteinen (nach Ott, 1998).

In Anbetracht der Interaktion von β 1-Integrinen mit dem TF-VIIa-PAR2-Signalweg könnte damit der Einfluß von TF auf die Transmigration von Eosinophilen erklärt werden. Möglicherweise erfolgt nach Bindung des Eosinophilen durch VLA-4 an VCAM1 eine Antagonisierung der TF-bedingten Hemmung des β 1-Integrins durch Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne. Damit könnte eine Zellmigration initiiert werden (Abb. 24-1). Diese Hypothese ist mit unseren Ergebnissen vereinbar, dass TF eine Rolle bei der frühen Transmigration von Eosinophilen spielt. Die Bedeutung des TF auf Eosinophilen bei der Kontaktaufnahme mit dem Endothel erscheint hingegen wenig wahrscheinlich, da diese Phase der Transmigration durch anti-TF-Antikörper nicht gehemmt werden konnte.

6. TF auf Eosinophilen – potentielle Bedeutung bei Eosinophilen-assoziierten Krankheiten

Da sich eosinophile Granulozyten nur zu einem kleinen Teil im peripheren Blut befinden, könnte dem Eosinophilen-TF vor allem nach der Emigration ins Gewebe, so z.B. in der Haut bei bullösem Pemphigoid [Marzano, 2009a], eine Bedeutung zukommen. Ebenso ist an eine gerinnungsunabhängige Rolle des Eosinophilen-TF zu denken. Welche Rolle spielt nun der Eosinophilen-TF *in vivo*? Um diese Frage anzugehen, werden im Folgenden Krankheitsbilder betrachtet, bei denen eosinophile Granulozyten an der Pathogenese maßgeblich beteiligt sind.

a. Autoimmunerkrankungen der Haut

Beim bullösen Pemphigoid kommt es durch eine Autoimmunreaktion mit IgG-Antikörpern gegen zwei hemidesmosomale Antigene zu einer Entzündungsreaktion und einer dermoepidermalen Blasenbildung. Dabei besteht das entzündliche Infiltrat aus Lymphozyten und zahlreichen Eosinophilen. In immunhistochemischen Untersuchungen der Haut von Patienten mit floridem bullösen Pemphigoid zeigte sich eine ausgeprägte TF-Expression, die mit ECP – einem Eosinophilen-spezifischen Protein - ko-lokalisiert werden konnte [Marzano, 2009a]. Ebenso zeigte sich bei Patienten mit chronischer Urtikaria, die sich durch eine entzündliche Hautreaktion mit Infiltraten aus Lymphozyten und Eosinophilen auszeichnet, in der Haut eine Ko-Lokalisation von TF mit Eosinophilen [Cugno, 2009]. Im Gegensatz dazu wurde z.B. beim Pemphigus vulgaris, einer blasenbildenden Autoimmunerkrankung ohne sichtbare Entzündungsreaktion und mit lymphozytärem Infiltrat, aber nur wenig oder keinen

Eosinophilen, kein TF in der Haut nachgewiesen [Marzano, 2009b]. Auch in normaler Haut wurde immunhistochemisch kein TF detektiert.

Im Plasma von Patienten mit floridem bullösem Pemphigoid [Marzano, 2009a] und chronischer Urtikaria [Asero, 2006] zeigten sich signifikant erhöhte Serumspiegel von Prothrombin-Fragment 1+2, was auf eine Thrombinbildung als Folge einer Gerinnungsaktivierung zurückzuführen ist. Beim Pemphigus vulgaris hingegen ergab sich bei normalen Serumspiegeln von Prothrombin-Fragment 1+2 kein Hinweis auf eine Gerinnungsaktivierung mit Thrombinbildung [Marzano, 2009b].

Der offensichtlichste Unterschied zwischen chronischer Urtikaria und bullösem Pemphigoid einerseits und Pemphigus vulgaris andererseits ist der Nachweis bzw. das Fehlen von eosinophilen Granulozyten und Eosinophilen-TF. Wahrscheinlich ist dies im weitesten Sinne für die klinischen Unterschiede (Entzündung, Gerinnungsaktivierung) essentiell. Die Aktivierung des extrinsischen Gerinnungssystems durch den von Eosinophilen exprimierten TF liegt dabei nahe. Durch Thrombinbildung und möglicherweise auch durch TF-abhängige Signaltransduktion, kommt es zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion durch Induktion einer Vielzahl von proinflammatorischen Mediatoren [Chu, 2005]. Insbesondere bei chronischer Urtikaria, die sich nur in ca. der Hälfte der Fälle sicher auf eine autoimmune Genese zurückführen lässt, scheint der Gerinnungsaktivierung mit Thrombinbildung bei der Pathogenese eine Bedeutung zuzukommen: Bei Therapieversagern der *first-line* Therapie mit Antihistaminika konnte durch Gabe von Heparin [Chua, 2005] oder Cumarinen [Parslew, 2000] ein Anprechen mit Symptombesserung beobachtet werden.

Interessanterweise zeigte sich bei den Patienten mit bullösem Pemphigoid eine deutlich erhöhte Inzidenz von tiefen Beinvenenthrombosen (8%/Jahr) im Vergleich zu Patienten mit Pemphigus vulgaris (0-2%/Jahr). Die Inzidenz bei Pemphigus vulgaris entspricht in etwa der in einem vergleichbaren gesunden Kollektiv [Marzano, 2009b]. Bisher liegen keine Daten zu thrombotischen Ereignissen bei Patienten mit chronischer Urtikaria vor, dies sollte durch entsprechende Studien untersucht werden. Bei 50% der Patienten mit bullösem Pemphigoid traten in einer retrospektiven Analyse innerhalb von 4 Jahren thrombotische Komplikationen auf [Marzano, 2009a]. Ob die erhöhte Thromboseneigung sich auf eine Initiation der Gerinnung durch von Eosinophilen präsentierten TF zurückzuführen ist werden zukünftige Untersuchungen zeigen.

b. Asthma bronchiale

In einer gesunden Lunge besteht eine sorgfältige Balance der Gerinnung durch ein System von prokoagulatorischen und profibrinolytischen Regulationsmechanismen. Dabei liegt das Gleichgewicht eher auf Seite der profibrinolytischen Vorgänge [Chambers, 2008]. In einer pathologischen Situation wie z.B. bei einer chronischen Entzündung im Rahmen eines Asthma bronchiale verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten der prokoagulatorischen Seite. So konnten z.B. neben einem Anstieg der Eosinophilen 48h nach Allergen-Exposition auch deutlich erhöhte Thrombinkonzentrationen in der Lavage-Flüssigkeit von Asthma-Patienten detektiert werden [Gabazza, 1999; Terada, 2004]. Erhöhte Thrombin-Konzentrationen sprechen für eine Aktivierung der Gerinnungskaskade, da im normalen Plasma kein Thrombin vorkommt. Andererseits konnte gezeigt werden, dass Fibrinolyseinhibitoren wie z.B. PAI-1 bei Patienten mit schwerem Asthma deutlich erhöht waren [Brims, 2009]. In durch hypertone Salzlösung induziertem Sputum von Patienten mit schwerem Asthma wurden im Vergleich zu gesunden Patienten erhöhte TF-Level und ein Anstieg der Eosinophilen-Zahl nachgewiesen. Dabei zeigte sich erheblich mehr TF als erwartet, was als Hinweis auf eine lokale Quelle des detektierten TF gesehen wurde [Brims, 2009]. Dies könnte unseren Ergebnissen zufolge durch den Eosinophilen-TF bedingt sein. Gegen eine relevante Beteiligung des TF auf Eosinophilen an einer frühen Initiierung der Gerinnung sprechen allerdings Daten für eine Aktivierung des Gerinnungssystems schon 4h nach Allergenexposition, wo noch kein massiver Anstieg der Eosinophilenzahl im Gewebe beobachtet wurde [Schouten, 2009].

Es wurde ein Zusammenhang zwischen einer genetisch bedingten TF-Überexpression (ein -603A->G-Polymorphismus) und dem Auftreten von Asthma bei Erwachsenen postuliert [Isada, 2010]. Bei einer Population von 825 Patienten konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und dem Auftreten von Asthma beim Erwachsenen nachgewiesen werden; bei einer anderen Population mit 1654 Patienten zeigte sich ein Trend, jedoch keine Signifikanz.

Nach Butchard *et al* ist eine Eosinophilie bei Patienten nach Herzklappenersatz ein unabhängiger Risikofaktor für das Auftreten von thromboembolischen Ereignissen [Butchard, 2003]. Daher stellt sich die Frage, ob Patienten mit Asthma bronchiale neben der lokalen Gerinnungsaktivierung in der Lunge auch eine erhöhte Thromboseneigung aufweisen. Hier

sind weitere Untersuchungen zum Auftreten von Thrombosen bei Asthma bronchiale erforderlich, bei denen auch die Bedeutung des Eosinophilen-TF zu klären sein wird.

c. Idiopathisches hypereosinophiles Syndrom (HES)

Beim idiopathischen hypereosinophilen Syndrom handelt es sich um ein heterogenes Krankheitsbild aus dem leukoproliferativen Formenkreis, das sich durch dauerhaft deutlich erhöhte Eosinophilenzahlen im Knochenmark und peripheren Blut auszeichnet.

Im Rahmen eines HES werden zahlreiche Organmanifestationen beobachtet. Mit am häufigsten – und auch mit den schwerwiegendsten Folgen – ist eine kardiale Beteiligung. Die kardiale Schädigung durchläuft drei Stadien: Zunächst treten eosinophile Mikroabszesse und Myokardnekrosen auf, die wahrscheinlich durch die zytotoxischen basischen Proteine der Eosinophilen entstehen [Sasano, 1989]. Dies wird gefolgt von einer ausgeprägten intrakardialen Thrombusbildung, die oft mit Thrombembolien mit sekundären Organschäden einhergeht. Im weiteren Verlauf geht die Erkrankung in ein fibrotisches Stadium über [Ogbogu, 2007].

Weitere Organmanifestationen wie ischämische Infarkte im Gehirn [Sarazin, 2004], Angioödem mit Urtikaria oder juckende Papeln und Knoten in der Haut [Parker, 1988] oder Sehstörungen [Chaine, 1982] werden als thromboembolische bzw. lokalthrombotische Ereignisse gewertet. Zum Beispiel war ein akutes Nierenversagen im Rahmen eines HES histologisch auf eine thrombotische Mikroangiopathie zurückzuführen. Es konnten periglomerulär zahlreiche degranulierte Eosinophile und subendotheliale Fibrinablagerungen nachgewiesen werden. Die Autoren sehen einen prothrombotischen Effekt durch einen Endothelschaden durch toxische Proteine aus den eosinophilen Granula [Liapis, 2005], jedoch kommt hier möglicherweise auch eine direkte Gerinnungsaktivierung durch präsentierten Eosinophilen-TF zum Tragen.

Die Morbidität beim hypereosinophilen Syndrom wird hauptsächlich durch die thrombotischen Komplikationen bestimmt. Diese werden einerseits auf einen Endothelschaden durch die toxische Wirkung der Eosinophilen-Infiltrate mit konsekutiver Exposition von subendothelialen Strukturen und Start der physiologischen Gerinnungskaskade zurückgeführt. Andererseits könnte auch die Exposition von TF durch Eosinophile an den thrombotischen Ereignissen beteiligt sein.

d. Atherosklerose – koronare Herzkrankheit

Eosinophile rücken in letzter Zeit auch ins Blickfeld der Erforschung des akuten Koronarsyndroms. So zeigte sich z.B. bei erhöhten Eosinophilenzahlen ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko [Lee CD, 2001], und Eotaxin – ein hochspezifischer chemotaktischer Stimulus für Eosinophile – war nicht nur im Blut von Patienten mit koronarer Herzkrankheit im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöht [Economou, 2001], sondern wurde auch in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen [Haley, 2000]. Genetische Veränderungen, die mit einer vermehrten Eotaxin-Bildung [Zee, 2004] oder erhöhten Eosinophilenzahlen einhergehen [Gudbjartsson, 2009], wurden ebenfalls mit einem erhöhten Herzinfarkt-Risiko verbunden. Diese Ergebnisse veranlassten Niccoli *et al* (2010) dazu ECP – ein Eosinophilen-spezifisches Protein - als prognostischen Marker für die koronare Herzkrankheit vorzuschlagen, der mit dem Schweregrad der Koronarsklerose korreliert [Niccoli, 2010a].

Kürzlich wurde auch ein Zusammenhang zwischen Eosinophilen und Thrombuswachstum postuliert [Sakai, 2009]. In dieser Studie wurde Thrombusmaterial untersucht, das im Rahmen einer Coronarangiographie durch Thrombusaspiration gewonnen wurde. Die Thromben wurden auf Größe, das Verhältnis von weißem (Plättchen) zu rotem (Erythrozyten) Thrombus und Eosinophilen-Gehalt (0-1, 2-4, >5 Eos pro Blickfeld) untersucht. In 64% der Thromben wurden Eosinophile detektiert. Es zeigte sich, dass die Thromben mit hohem Eosinophilen-Gehalt größer waren und im Verhältnis mehr roten Thrombus enthielten, während die Menge an weißem Thrombus konstant blieb. Hieraus wird eine mögliche Rolle der Eosinophilen beim Thrombuswachstum abgeleitet, entweder durch die Sekretion von zytotoxischen Proteinen oder auch durch Präsentation von TF.

Nach Stent-Implantation bei relevanten Stenosen im Rahmen einer koronaren Herzkrankheit können im Verlauf thrombotische Komplikationen auftreten. Man unterscheidet zwischen *in-stent* Restenose und akut lebensbedrohlicher Stentthrombose. Durch Einführung von sog. *drug eluting stents* (DES), die aus einem Polymer lokal antiproliferative und antientzündliche Substanzen (z.B. Paclitaxel) abgeben, wurde die Anzahl der frühen *in-stent* Restenosen signifikant gesenkt. Die zuvor verwendeten *bare metal stents* (BMS) führten über eine frühe lokale Entzündungsreaktion zu lokal-thrombotischen Ereignissen. Allerdings fielen in der Verlaufsbeobachtung nach DES-Implantation zunehmend späte (> 1 Jahr) thrombotische Komplikationen auf [Niccoli 2010b]. Dabei zeigten sich vor allem in Stents mit Polymer in einem *follow up* nach 2 Jahren *in-stent* Restenosen [Byrne, 2009]; ebenso traten in diesem

Zeitfenster bei DES gehäuft Stentthrombosen auf [Stone, 2007]. Ursächlich dafür scheint z.B. eine verzögerte Heilung mit inkompletter Endothelialisierung oder eine schlechte Anlagerung der Stents an die Gefäßwand zu sein. Daneben kommt es auch zu einer lokalen allergischen Reaktion (Typ IV) mit zahlreichen Eosinophilen in der Gefäßwand, die durch Stent-Bestandteile wie z.B. das Träger-Polymer ausgelöst wird [Joner, 2006]. Histopathologisch wurden bei Patienten, die an einer Stentthrombose in einem DES verstorben waren, ausgeprägte eosinophile Infiltrate in der gesamten Gefäßwand nachgewiesen, weiterhin zeigten sich endoluminale Thromben und Fibrinbildung um das Stentmaterial. Bei Thrombosen in BMS fehlten eosinophile Infiltrate [Virmani, 2004; Nebeker, 2006]. In einer Untersuchung von aspirierten Thromben nach Myokardinfarkt unterschiedlicher Genese fielen bei Patienten mit später Stentthrombose nach Implantation eines DES signifikant mehr Eosinophile im Thrombusmaterial auf [Cook, 2009]. Weiterhin zeigte sich, dass ECP ein prognostischer Marker für das Auftreten von thrombotischen Komplikationen nach DES-Implantation zu sein scheint, wohingegen das nach BMS-Implantation prognostisch verwertbare CRP hier keine Aussagekraft besitzt [Niccoli, 2009].

Zusammengenommen weisen diese Ergebnisse auf eine Beteiligung der Eosinophilen bei der Pathogenese von späten thrombotischen Ereignissen nach Implantation von DES hin, am ehesten im Rahmen einer lokal allergischen Reaktion vom verzögerten Typ. Der Eosinophilen-TF könnte hier durch direkte Aktivierung des extrinsischen Gerinnungssystems zur Thrombusbildung beitragen.

7. Ausblick

Die Expression von TF durch eosinophile Granulozyten könnte prinzipiell bei einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen von Bedeutung sein. Einerseits kommt es durch Eosinophilen-TF zu einer Initiierung der Gerinnung, wodurch Thrombin bzw. Fibrin entstehen und unter pathologischen Bedingungen Thrombosen induziert werden könnten. Andererseits könnte es über TF-VIIa-abhängige PAR2-Signaltransduktion – und möglicherweise auch über eine direkte Signaltransduktion durch die zytoplasmatische Domäne – zu einer proinflammatorischen und promigratorischen Antwort der Eosinophilen kommen, mit einer konsekutiven Verstärkung der Entzündung, z.B. durch Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren.

Momentan ist die Beteiligung von TF an diesen Vorgängen noch weitgehend ungeklärt. Daher sind in Zukunft weitere Untersuchungen über die funktionelle Bedeutung des Eosinophilen-TF inner- und außerhalb des Gefäßsystems dringend erforderlich.

VI. Zusammenfassung

Eosinophile Granulozyten sind multifunktionale Zellen, deren physiologische Bedeutung noch weitgehend unklar ist und die unter pathologischen Bedingungen wie z.B. bei allergischen oder parasitären Erkrankungen wichtige Effektorzellen sind. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eosinophile Granulozyten präformierten TF enthalten, das Starterprotein der Blutgerinnung. TF wurde in eosinophilen Vorläuferzellen im Knochenmark wie in reifen eosinophilen Granulozyten im peripheren Blut nachgewiesen. Eosinophile Granulozyten können TF *de novo* synthetisieren. Die Neusynthese von TF wurde durch Stimulation mit GMCSF/PAF erhöht. Der Eosinophilen-TF wurde nach Aktivierung der Zellen auf der Oberfläche präsentiert. Während in intakten Eosinophilen keine prokoagulatorische Aktivität beobachtet wurde, kam es nach Zell-Lyse zu einer funktionellen Aktivierung des Eosinophilen-TF. Dies spricht für eine sogenannte *encryption* von TF auf der Oberfläche intakter eosinophiler Granulozyten.

Anti-TF-Antikörper hemmten die Transmigration von Eosinophilen durch aktiviertes Endothel. Dabei inhibierten die Antikörper nicht die Adhäsion der Eosinophilen an das Endothel, sondern reduzierten die Transmigration der Zellen durch einen endothelialen Monolayer. Dieser Effekt war im frühen Stadium der Transmigration am ausgeprägtesten.

Bei vielen mit Eosinophilen assoziierten Krankheiten wurde eine deutlich erhöhte Thromboseneigung beobachtet (z.B. hypereosinophiles Syndrom, Autoimmunerkrankungen der Haut, aber auch thrombotische Ereignisse nach Implantation von DES mit lokal allergischer Reaktion). Aufgrund der zentralen Bedeutung von TF für die Induktion von thrombotischen Ereignissen ist davon auszugehen, dass der Eosinophilen-TF hierbei eine erhebliche Rolle spielt.

TF besitzt neben seiner Funktion als Initiator der Blutgerinnung noch zahlreiche andere Funktionen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass der Eosinophilen-TF eine Bedeutung bei der frühen Transmigration der Eosinophilen durch das Endothel hat. Hier könnte z.B. eine TF-VIIa-Komplex-abhängige Aktivierung von PAR2 mit konsekutiven promigratorischen bzw. proinflammatorischen Effekten zum Tragen kommen.

Literaturverzeichnis

Abraham E, Reinhart K, Opal S, Demeyer I, Doig C, Rodriguez AL, Beale R, Svoboda P, Laterre PF, Simon S, Light B, Spapen H, Stone J, Seibert A, Peckelsen C, De Deyne C, Postier R, Pettilä V, Artigas A, Percell SR, Shu V, Zwingelstein C, Tobias J, Poole L, Stolzenbach JC, Creasey AA; OPTIMIST Trial Study Group.

Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis: a randomized controlled trial.

JAMA. 290:238-47 (2003)

Ahamed J, Versteeg HH, Kerver M, Chen VM, Mueller BM, Hogg PJ, Ruf W.

Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling.

Proc Natl Acad Sci U S A. 103:13932-7 (2006)

Ames PR, Aye WW.

Pleural mesothelioma and venous thrombosis: the eosinophilia link.

Thromb J. 6:3 (2008)

Aristoteles, 4. Jahrhundert v.Chr.

De partibus animalium

übersetzt von Paul Gohlke: *Über die Glieder der Geschöpfe*, 1959 (Aristoteles: *Die Lehrschriften* Bd. 8,2)

Asero R, Tedeschi A, Riboldi P, Cugno M.

Plasma of patients with chronic urticaria shows signs of thrombin generation, and its intradermal injection causes wheal-and-flare reactions much more frequently than autologous serum.

J Allergy Clin Immunol. 117:1113-7 (2006)

Bach RR.

Tissue factor encryption.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 26:456-61 (2006)

Bandeira-Melo C, Bozza PT, Weller PF.

The cellular biology of eosinophil eicosanoid formation and function.

J Allergy Clin Immunol. 109:393-400 (2002)

Belting M, Ahamed J, Ruf W.

Signaling of the tissue factor coagulation pathway in angiogenesis and cancer.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 25:1545-50 (2005)

Belting M, Dorrell MI, Sandgren S, Aguilar E, Ahamed J, Dorfleutner A, Carmeliet P, Mueller BM, Friedlander M, Ruf W.

Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling.

Nat Med. 10:502-9 (2004)

Benninghoff

Anatomie – Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen, Band 1

15. Auflage, Urban und Schwarzenberg (1994)

Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M, Nemerson Y.

Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein.

Nat Med. 9:458-62 (2003)

Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barnéon G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony-Lafontaine J, Godard P, et al.

Eosinophilic inflammation in asthma.

N Engl J Med. 323:1033-9 (1990)

Brand K, Fowler BJ, Edgington TS, Mackman N.

Tissue factor mRNA in THP-1 monocytic cells is regulated at both transcriptional and posttranscriptional levels in response to lipopolysaccharide.

Mol Cell Biol. 11:4732-8 (1991)

Brims FJ, Chauhan AJ, Higgins B, Shute JK.

Coagulation factors in the airways in moderate and severe asthma and the effect of inhaled steroids.

Thorax. 64:1037-43 (2009)

Bromberg ME, Sundaram R, Homer RJ, Garen A, Konigsberg WH.

Role of tissue factor in metastasis: functions of the cytoplasmic and extracellular domains of the molecule.

Thromb Haemost. 82:88-92 (1999)

Broze GJ Jr, Majerus PW.

Purification and properties of human coagulation factor VII.

J Biol Chem. 255:1242-7 (1980)

Bugge TH, Xiao Q, Kombrinck KW, Flick MJ, Holmback K, Danton MJ, Colbert MC, Witte DP, Fujikawa K, Davie EW, Degen JL.

Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation.

Proc Natl Acad Sci U S A. 93:6258-63 (1996)

Bunnett NW.

Protease-activated receptors: how proteases signal to cells to cause inflammation and pain.

Semin Thromb Hemost. 32 Suppl 1:39-48 (2006)

Butterworth AE.

The eosinophil and its role in immunity to helminth infection.

Curr Top Microbiol Immunol. 77:127-68 (1977)

- Byrne RA, Iijima R, Mehilli J, Piniack S, Bruskina O, Schömig A, Kastrati A.
Durability of antirestenotic efficacy in drug-eluting stents with and without permanent polymer.
JACC Cardiovasc Interv. 2:291-9 (2009)
- Camera M, Frigerio M, Toschi V, Brambilla M, Rossi F, Cottell DC, Maderna P, Parolari A, Bonzi R, De Vincenti O, Tremoli E.
Platelet activation induces cell-surface immunoreactive tissue factor expression, which is modulated differently by antiplatelet drugs.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 23:1690-6 (2003)
- Camerer E, Cornelissen I, Kataoka H, Duong DN, Zheng YW, Coughlin SR.
Roles of protease-activated receptors in a mouse model of endotoxemia.
Blood. 107:3912-21 (2006)
- 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. 97:5255-60 (2000)
- 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. 274:32225-33 (1999)
- Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Van Vlaenderen 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. 383(6595):73-5 (1996)
- Chaine G, Davies J, Kohner EM, Hawarth S, Spry CJ.
Ophthalmologic abnormalities in the hypereosinophilic syndrome.
Ophthalmology. 1982 Dec;89:1348-56.
- Chambers RC.
Procoagulant signalling mechanisms in lung inflammation and fibrosis: novel opportunities for pharmacological intervention?
Br J Pharmacol. 153 Suppl 1:S367-78 (2008)
- Chen VM, Ahamed J, Versteeg HH, Berndt MC, Ruf W, Hogg PJ.
Evidence for activation of tissue factor by an allosteric disulfide bond.
Biochemistry. 45:12020-8 (2006)
- Chou J, Mackman N, Merrill-Skoloff G, Pedersen B, Furie BC, Furie B.
Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation.
Blood. 104:3190-7 (2004)

Chu AJ.

Tissue factor mediates inflammation.

Arch Biochem Biophys. 440:123-32 (2005)

Chua SL, Gibbs S.

Chronic urticaria responding to subcutaneous heparin sodium.

Br J Dermatol. 153:216-7 (2005)

Cook S, Ladich E, Nakazawa G, Eshtehardi P, Neidhart M, Vogel R, Togni M, Wenaweser P, Billinger M, Seiler C, Gay S, Meier B, Pichler WJ, Jüni P, Virmani R, Windecker S.

Correlation of intravascular ultrasound findings with histopathological analysis of thrombus aspirates in patients with very late drug-eluting stent thrombosis.

Circulation. 120:391-9 (2009)

Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, Stover EH, Legare RD, Cortes J, Kutok J, Clark J, Galinsky I, Griffin JD, Cross NC, Tefferi A, Malone J, Alam R, Schrier SL, Schmid J, Rose M, Vandenberghe P, Verhoef G, Boogaerts M, Wlodarska I, Kantarjian H, Marynen P, Coutre SE, Stone R, Gilliland DG.

A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome.

N Engl J Med. 348:1201-14 (2003)

Cugno M, Marzano AV, Tedeschi A, Fanoni D, Venegoni L, Asero R.

Expression of tissue factor by eosinophils in patients with chronic urticaria.

Int Arch Allergy Immunol. 148:170-4 (2009)

Cuvelier SL, Patel KD.

Shear-dependent eosinophil transmigration on interleukin 4-stimulated endothelial cells: a role for endothelium-associated eotaxin-3.

J Exp Med. 194:1699-709 (2001)

Day SM, Reeve JL, Pedersen B, Farris DM, Myers DD, Im M, Wakefield TW, Mackman N, Fay WP.

Macrovascular thrombosis is driven by tissue factor derived primarily from the blood vessel wall.

Blood. 105:192-8 (2005)

Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, López JA.

Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation.

Blood. 106:1604-11 (2005)

Dorfleutner A, Hintermann E, Tarui T, Takada Y, Ruf W.

Cross-talk of integrin alpha3beta1 and tissue factor in cell migration.

Mol Biol Cell. 15:4416-25 (2004)

Economou E, Tousoulis D, Katinioti A, Stefanadis C, Trikas A, Pitsavos C, Tentolouris C, Toutouza MG, Toutouzas P.

Chemokines in patients with ischaemic heart disease and the effect of coronary angioplasty.

Int J Cardiol. 80:55-60 (2001)

- Eddleston M, de la Torre JC, Oldstone MB, Loskutoff DJ, Edgington TS, Mackman N.
Astrocytes are the primary source of tissue factor in the murine central nervous system. A role for astrocytes in cerebral hemostasis.
J Clin Invest. 92:349-58 (1993)
- Edgington TS, Mackman N, Brand K, Ruf W.
The structural biology of expression and function of tissue factor.
Thromb Haemost. 66:67-79 (1991)
- Egesten A, Calafat J, Janssen H, Knol EF, Malm J, Persson T.
Granules of human eosinophilic leucocytes and their mobilization.
Clin Exp Allergy. 31:1173-88 (2001)
- Egorina EM, Sovershaev MA, Bjørkøy G, Gruber FX, Olsen JO, Parhami-Seren B, Mann KG, Østerud B.
Intracellular and surface distribution of monocyte tissue factor: application to intersubject variability.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 25:1493-8 (2005)
- Egorina EM, Sovershaev MA, Olsen JO, Østerud B.
Granulocytes do not express but acquire monocyte-derived tissue factor in whole blood: evidence for a direct transfer.
Blood. 111:1208-16 (2008)
- Eilertsen KE, Østerud B.
Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology.
Blood Coagul Fibrinolysis. 15:521-38 (2004)
- Engelmann B, Luther T, Müller I.
Intravascular tissue factor pathway--a model for rapid initiation of coagulation within the blood vessel.
Thromb Haemost. 89:3-8 (2003)
- Falati S, Gross P, Merrill-Skoloff G, Furie BC, Furie B.
Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse.
Nat Med. 8:1175-81 (2002)
- Faulk WP, Labarrere CA, Carson SD.
Tissue factor: identification and characterization of cell types in human placentae.
Blood. 76:86-96 (1990)
- Fischer EG, Riewald M, Huang HY, Miyagi Y, Kubota Y, Mueller BM, Ruf W.
Tumor cell adhesion and migration supported by interaction of a receptor-protease complex with its inhibitor.
J Clin Invest. 104:1213-21 (1999)

Flood-Page P, Menzies-Gow A, Phipps S, Ying S, Wangoo A, Ludwig MS, Barnes N, Robinson D, Kay AB.

Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics.

J Clin Invest. 112:1029-36 (2003b)

Flood-Page PT, Menzies-Gow AN, Kay AB, Robinson DS.

Eosinophil's role remains uncertain as anti-interleukin-5 only partially depletes numbers in asthmatic airway.

Am J Respir Crit Care Med. 167:199-204 (2003a)

Fredens K, Dahl R, Venge P.

In vitro studies of the interaction between heparin and eosinophil cationic protein.

Allergy. 46:27-9 (1991)

Gabazza EC, Taguchi O, Tamaki S, Takeya H, Kobayashi H, Yasui H, Kobayashi T, Hataji O, Urano H, Zhou H, Suzuki K, Adachi Y.

Thrombin in the airways of asthmatic patients.

Lung. 177:253-62 (1999)

Ge L, Ly Y, Hollenberg M, DeFea K.

A beta-arrestin-dependent scaffold is associated with prolonged MAPK activation in pseudopodia during protease-activated receptor-2-induced chemotaxis.

J Biol Chem. 278:34418-26 (2003)

Giembycz MA, Lindsay MA.

Pharmacology of the eosinophil.

Pharmacol Rev. 51:213-340 (1999)

Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roqué M, Fallon JT, Badimon JJ, Hember J, Riederer MA, Nemerson Y.

Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis.

Proc Natl Acad Sci U S A. 96:2311-5 (1999)

Gudbjartsson DF, Bjornsdottir US, Halapi E, Helgadottir A, Sulem P, Jonsdottir GM, Thorleifsson G, Helgadottir H, Steinthorsdottir V, Stefansson H, Williams C, Hui J, Beilby J, Warrington NM, James A, Palmer LJ, Koppelman GH, Heinzmann A, Krueger M, Boezen HM, Wheatley A, Altmuller J, Shin HD, Uh ST, Cheong HS, Jonsdottir B, Gislason D, Park CS, Rasmussen LM, So WY, Ma R, Shah SH, Granger CB, Quyyumi AA, Levey AI, Vaccarino V, Reilly MP, Rader DJ, Williams MJ, van Rij AM, Jones GT, Trabetti E, Malerba G, Pignatti PF, Postma DS, Gislason T, Gulcher J, Kong A, Jonsdottir I, Thorsteinsdottir U, Stefansson K.

Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction.

Nat Genet. 41:342-7 (2009)

Haley KJ, Lilly CM, Yang JH, Feng Y, Kennedy SP, Turi TG, Thompson JF, Sukhova GH, Libby P, Lee RT.

Overexpression of eotaxin and the CCR3 receptor in human atherosclerosis: using genomic technology to identify a potential novel pathway of vascular inflammation.

Circulation. 102:2185-9 (2000)

Hammarsten O

Über die Bedeutung der löslichen Kalksalze bei der Faserstoffgerinnung
Z physiol Chem 333 (1896)

Hardy WR, Anderson RE.

The hypereosinophilic syndromes.
Ann Intern Med. 68:1220-9 (1968)

Harlos K, Martin DM, O'Brien DP, Jones EY, Stuart DI, Polikarpov I, Miller A, Tuddenham EG, Boys CW.

Crystal structure of the extracellular region of human tissue factor.
Nature. 370(6491):662-6 (1994)

Hjortoe GM, Petersen LC, Albrektsen T, Sorensen BB, Norby PL, Mandal SK, Pendurthi UR, Rao LV.

Tissue factor-factor VIIa-specific up-regulation of IL-8 expression in MDA-MB-231 cells is mediated by PAR-2 and results in increased cell migration.
Blood. 103:3029-37 (2004)

Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, Kay AB, Rothenberg ME.

Eosinophils: biological properties and role in health and disease.
Clin Exp Allergy. 38:709-50 (2008)

Horigome K, Bullock ED, Johnson EM Jr.

Effects of nerve growth factor on rat peritoneal mast cells. Survival promotion and immediate-early gene induction.
J Biol Chem. 269:2695-702 (1994)

Humbles AA, Lu B, Friend DS, Okinaga S, Lora J, Al-Garawi A, Martin TR, Gerard NP, Gerard C.

The murine CCR3 receptor regulates both the role of eosinophils and mast cells in allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness.
Proc Natl Acad Sci U S A. 99:1479-84 (2002)

Hussain A, Brown PJ, Thwaites BC, Hastings AG.

Eosinophilic endomyocardial disease due to high grade chest wall sarcoma.
Thorax. 49:1040-1 (1994)

Isada A, Konno S, Hizawa N, Tamari M, Hirota T, Harada M, Maeda Y, Hattori T, Takahashi A, Nishimura M.

A functional polymorphism (-603A --> G) in the tissue factor gene promoter is associated with adult-onset asthma.
J Hum Genet. 55:167-74 (2010)

Jacoby DB, Gleich GJ, Fryer AD.

Human eosinophil major basic protein is an endogenous allosteric antagonist at the inhibitory muscarinic M2 receptor.
J Clin Invest. 91:1314-8 (1993)

Joner M, Finn AV, Farb A, Mont EK, Kolodgie FD, Ladich E, Kutys R, Skorija K, Gold HK, Virmani R.
Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk.
J Am Coll Cardiol. 48:193-202 (2006)

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. 14:407-10 (1988)

Kay AB, Phipps S, Robinson DS.
A role for eosinophils in airway remodelling in asthma.
Trends Immunol. 25:477-82 (2004)

Key Nigel S, Jian-Gou Geng, Ronald R Bach
Tissue factor: From Morawitz to microparticles
Transactins of the American clinical and climatological Association 2007

Kleinfeldt T, Nienaber CA, Kische S, Akin I, Turan RG, Körber T, Schneider H, Ince H.
Cardiac manifestation of the hypereosinophilic syndrome: new insights.
Clin Res Cardiol. 99:419-27 (2010)

Leatham EW, Bath PM, Tooze JA, Camm AJ.
Increased monocyte tissue factor expression in coronary disease.
Br Heart J. 73:10-3 (1995)

Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, Mathur AK, Cowley HC, Chung KF, Djukanovic R, Hansel TT, Holgate ST, Sterk PJ, Barnes PJ.
Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response.
Lancet. 356(9248):2144-8 (2000)

Lee CD, Folsom AR, Nieto FJ, Chambless LE, Shahar E, Wolfe DA.
White blood cell count and incidence of coronary heart disease and ischemic stroke and mortality from cardiovascular disease in African-American and White men and women: atherosclerosis risk in communities study.
Am J Epidemiol. 154:758-64 (2001)

Liapis Helen, Albert K Ho, Diane Brown, Graeme Mindel, Gerald Gleich
Thrombotic microangiopathy associated with the hypereosinophilic syndrome
Kidney international 67:1806-1811 (2005)

Luther T, Dittert DD, Kotzsch M, Erlich J, Albrecht S, Mackman N, Müller M.
Functional implications of tissue factor localization to cell-cell contacts in myocardium.
J Pathol. 192:121-30 (2000)

MacKenzie JR, Mattes J, Dent LA, Foster PS.
Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4(+) Th2 lymphocyte function.
J Immunol. 167:3146-55 (2001)

Mackman N.

Regulation of the tissue factor gene.
Thromb Haemost. 78:747-54 (1997)

Mackman N.

Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 24:1015-22 (2004)

Manukyan D, von Bruehl ML, Massberg S, Engelmann B.

Protein disulfide isomerase as a trigger for tissue factor-dependent fibrin generation.
Thromb Res. 122 Suppl 1:S19-22 (2008)

Marzano AV, Tedeschi A, Fanoni D, Bonanni E, Venegoni L, Berti E, Cugno M.

Activation of blood coagulation in bullous pemphigoid: role of eosinophils, and local and systemic implications.
Br J Dermatol. 160:266-72 (2009a)

Marzano AV, Tedeschi A, Rossio R, Fanoni D, Cugno M.

Prothrombotic state in Churg-Strauss syndrome: a case report.
J Investig Allergol Clin Immunol. 20:616-9 (2010)

Marzano AV, Tedeschi A, Spinelli D, Fanoni D, Crosti C, Cugno M.

Coagulation activation in autoimmune bullous diseases.
Clin Exp Immunol. 158:31-6 (2009b)

Matthews AN, Friend DS, Zimmermann N, Sarafi MN, Luster AD, Pearlman E, Wert SE, Rothenberg ME.

Eotaxin is required for the baseline level of tissue eosinophils.
Proc Natl Acad Sci U S A. 95:6273-8 (1998)

Mezzano D, Matus V, Sáez CG, Pereira J, Panes O.

Tissue factor storage, synthesis and function in normal and activated human platelets.
Thromb Res. 122 Suppl 1:S31-6 (2008)

Milsom C, Rak J.

Tissue factor and cancer.
Pathophysiol Haemost Thromb. 36:160-76 (2008)

Mishra A, Hogan SP, Brandt EB, Rothenberg ME.

IL-5 promotes eosinophil trafficking to the esophagus.
J Immunol. 168:2464-9 (2002)

Mishra A, Hogan SP, Lee JJ, Foster PS, Rothenberg ME.

Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract.
J Clin Invest. 103:1719-27 (1999)

Morawitz, P

Die Chemie der Blutgerinnung.
Ergebnisse der Physiologie. 4:307-423 (1905)

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. 50:129-35 (1987)

Mueller BM, Reisfeld RA, Edgington TS, Ruf W.

Expression of tissue factor by melanoma cells promotes efficient hematogenous metastasis.

Proc Natl Acad Sci U S A. 89:11832-6 (1992)

Mueller BM, Ruf W.

Requirement for binding of catalytically active factor VIIa in tissue factor-dependent experimental metastasis.

J Clin Invest. 101:1372-8 (1998)

Müller 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. 17:476-8 (2003)

Müller J

Beobachtungen zur analyse der Lymphe, des Blutes und des Chylus

Poggendorfs Annalen 25: 537 (1832)

Müller M, Albrecht S, Gölfert F, Hofer A, Funk RH, Magdolen V, Flössel C, Luther T.

Localization of tissue factor in actin-filament-rich membrane areas of epithelial cells.

Exp Cell Res. 248:136-47 (1999)

Nebeker JR, Virmani R, Bennett CL, Hoffman JM, Samore MH, Alvarez J, Davidson CJ, McKoy JM, Raisch DW, Whisenant BK, Yarnold PR, Belknap SM, West DP, Gage JE, Morse RE, Gligoric G, Davidson L, Feldman MD.

Hypersensitivity cases associated with drug-eluting coronary stents: a review of available cases from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) project.

J Am Coll Cardiol. 47:175-81 (2006)

Niccoli G, Ferrante G, Cosentino N, Conte M, Belloni F, Marino M, Bacà M, Montone RA, Sabato V, Schiavino D, Patriarca G, Crea F.

Eosinophil cationic protein: A new biomarker of coronary atherosclerosis.

Atherosclerosis. 211:606-11 (2010a)

Niccoli G, Montone RA, Ferrante G, Crea F.

The evolving role of inflammatory biomarkers in risk assessment after stent implantation.

J Am Coll Cardiol. 56:1783-93 (2010b)

Niccoli G, Schiavino D, Belloni F, Ferrante G, La Torre G, Conte M, Cosentino N, Montone RA, Sabato V, Burzotta F, Trani C, Leone AM, Porto I, Pieroni M, Patriarca G, Crea F.
Pre-intervention eosinophil cationic protein serum levels predict clinical outcomes following implantation of drug-eluting stents.
Eur Heart J. 30:1340-7 (2009)

Odemuyiwa SO, Ghahary A, Li Y, Puttagunta L, Lee JE, Musat-Marcu S, Ghahary A, Moqbel R.
Cutting edge: human eosinophils regulate T cell subset selection through indoleamine 2,3-dioxygenase.
J Immunol. 173:5909-13 (2004)

Oeth P, Parry GC, Mackman N.
Regulation of the tissue factor gene in human monocytic cells. Role of AP-1, NF-kappa B/Rel, and Sp1 proteins in uninduced and lipopolysaccharide-induced expression.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 17:365-74 (1997)

Ogbogu PU, Rosing DR, Horne MK 3rd.
Cardiovascular manifestations of hypereosinophilic syndromes.
Immunol Allergy Clin North Am. 27:457-75 (2007)

Østerud B, Bjørklid E.
The tissue factor pathway in disseminated intravascular coagulation.
Semin Thromb Hemost. 27:605-17 (2001)

Osterud B.
Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathophysiological roles.
Blood Coagul Fibrinolysis. 9 Suppl 1:S9-14 (1998)

Østerud B.
Tissue factor expression in blood cells.
Thromb Res. 125 Suppl 1:S31-4 (2010)

Ott I, Fischer EG, Miyagi Y, Mueller BM, Ruf W.
A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280.
J Cell Biol. 140:1241-53 (1998)

Paborsky LR, Caras IW, Fisher KL, Gorman CM.
Lipid association, but not the transmembrane domain, is required for tissue factor activity. Substitution of the transmembrane domain with a phosphatidylinositol anchor.
J Biol Chem. 266:21911-6 (1991)

Parker CJ
Hypereosinophilic syndrome with cutaneous blisters and bowel necrosis.
Australas J Dermatol. 29:103-6 (1988)

Parmley RT, Spicer SS.

Cytochemical and ultrastructural identification of a small type granule in human late eosinophils.

Lab Invest. 30:557-67 (1974)

Parslew R, Pryce D, Ashworth J, Friedmann PS.

Warfarin treatment of chronic idiopathic urticaria and angio-oedema.

Clin Exp Allergy. 30:1161-5 (2000)

Pawlinski R, Mackman N.

Tissue factor, coagulation proteases, and protease-activated receptors in endotoxemia and sepsis.

Crit Care Med. 32(5 Suppl):S293-7 (2004)

Phipps S, Flood-Page P, Menzies-Gow A, Ong YE, Kay AB.

Intravenous anti-IL-5 monoclonal antibody reduces eosinophils and tenascin deposition in allergen-challenged human atopic skin.

J Invest Dermatol. 122:1406-12 (2004)

Piliponsky AM, Gleich GJ, Bar I, Levi-Schaffer F.

Effects of eosinophils on mast cells: a new pathway for the perpetuation of allergic inflammation.

Mol Immunol. 38:1369 (2002)

Randolph GJ, Luther T, Albrecht S, Magdolen V, Muller WA.

Role of tissue factor in adhesion of mononuclear phagocytes to and trafficking through endothelium in vitro.

Blood. 92:4167-77 (1998)

Rankin SM, Conroy DM, Williams TJ.

Eotaxin and eosinophil recruitment: implications for human disease.

Mol Med Today. 6:20-7 (2000)

Reinhardt C, von Brühl ML, Manukyan D, Grahl L, Lorenz M, Altmann B, Dlugai S, Hess S, Konrad I, Orschiedt L, Mackman N, Ruddock L, Massberg S, Engelmann B.

Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation.

J Clin Invest. 118:1110-22 (2008)

Reinhardt C.

New locations of intravascular tissue factor: indications.

Hamostaseologie. 27:55-8 (2007)

Riewald M, Ruf W.

Orchestration of coagulation protease signaling by tissue factor.

Trends Cardiovasc Med. 12:149-54 (2002)

Rivers RP, Hathaway WE, Weston WL.

The endotoxin-induced coagulant activity of human monocytes.

Br J Haematol. 30:311-6 (1975)

- Rohrbach MS, Wheatley CL, Slifman NR, Gleich GJ.
Activation of platelets by eosinophil granule proteins.
J Exp Med. 172:1271-4 (1990)
- Rosenberg HF, Phipps S, Foster PS.
Eosinophil trafficking in allergy and asthma.
J Allergy Clin Immunol. 119(6):1303-10; quiz 1311-2 (2007)
- Rothenberg ME
Eosinophilia
N. Engl. J. Med 338: 1592-600 (1998)
- Rothenberg ME, Hogan SP.
The eosinophil.
Annu Rev Immunol. 24:147-74 (2006)
- Rothenberg ME, Owen WF Jr, Silberstein DS, Soberman RJ, Austen KF, Stevens RL
Eosinophils cocultured with endothelial cells have increased survival and functional properties.
Science. 237(4815):645-7 (1987)
- Ruf W, Edgington TS.
Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo.
FASEB J. 8:385-90 (1994)
- Ruf W, Yokota N, Schaffner F.
Tissue factor in cancer progression and angiogenesis.
Thromb Res. 125 Suppl 2:S36-8 (2010)
- Sakai T, Inoue S, Matsuyama TA, Takei M, Ota H, Katagiri T, Koboyashi Y.
Eosinophils may be involved in thrombus growth in acute coronary syndrome.
Int Heart J. 50:267-77 (2009)
- Sarazin M, Caumes E, Cohen A, Amarenco P.
Multiple microembolic borderzone brain infarctions and endomyocardial fibrosis in idiopathic hypereosinophilic syndrome and in Schistosoma mansoni infestation.
J Neurol Neurosurg Psychiatry. 75:305-7 (2004)
- Sasano H, Virmani R, Patterson RH, Robnowitz M, Guccion JG
Eosinophilic products lead to myocardial damage.
Hum Patholog 20: 850 (1989)
- Scarpati EM, Wen D, Broze GJ Jr, Miletich JP, Flandermeyer RR, Siegel NR, Sadler JE.
Human tissue factor: cDNA sequence and chromosome localization of the gene.
Biochemistry. 26:5234-8 (1987)
- Schmidt A, Dorpat 1867
Die Lehre von den fermentativen Gerinnungserscheinungen in den eiweißhaltigen tierischen Flüssigkeiten

- Schouten M, VAN DE Pol MA, Levi M, VAN DER Poll T, VAN DER Zee JS.
Early activation of coagulation after allergen challenge in patients with allergic asthma.
J Thromb Haemost. 7:1592-4 (2009)
- Shi HZ.
Eosinophils function as antigen-presenting cells.
J Leukoc Biol. 76:520-7 (2004)
- Simon HU, Yousefi S, Schranz C, Schapowal A, Bachert C, Blaser K.
Direct demonstration of delayed eosinophil apoptosis as a mechanism causing tissue eosinophilia.
J Immunol. 158:3902-8 (1997)
- Simon HU.
Molecules involved in the regulation of eosinophil apoptosis.
Chem Immunol Allergy. 91:49-58 (2006)
- Slungaard A, Vercellotti GM, Tran T, Gleich GJ, Key NS.
Eosinophil cationic granule proteins impair thrombomodulin function. A potential mechanism for thromboembolism in hypereosinophilic heart disease.
J Clin Invest. 91:1721-30 (1993)
- Sorensen BB, Rao LV, Tornehave D, Gammeltoft S, Petersen LC.
Antiapoptotic effect of coagulation factor VIIa.
Blood. 102:1708-15 (2003)
- Sovershaev MA, Lind KF, Devold H, Jørgensen TØ, Hansen JB, Østerud B, Egorina EM.
No evidence for the presence of tissue factor in high-purity preparations of immunologically isolated eosinophils.
J Thromb Haemost. 6:1742-9 (2008)
- Stephens AC, Zheng RQ, Russell AR, Levin M, Rivers RP.
Production of tissue factor by monocyte progenitor cells.
Thromb Res. 76:33-45 (1994)
- Stone GW, Moses JW, Ellis SG, Schofer J, Dawkins KD, Morice MC, Colombo A, Schampaert E, Grube E, Kirtane AJ, Cutlip DE, Fahy M, Pocock SJ, Mehran R, Leon MB.
Safety and efficacy of sirolimus- and paclitaxel-eluting coronary stents.
N Engl J Med. 356:998-1008 (2007)
- Swartz JM, Dyer KD, Cheever AW, Ramalingam T, Pesnicak L, Domachowske JB, Lee JJ, Lee NA, Foster PS, Wynn TA, Rosenberg HF.
Schistosoma mansoni infection in eosinophil lineage-ablated mice.
Blood. 108:2420-7 (2006)
- Taylor FB Jr, Chang A, Ruf W, Morrissey JH, Hinshaw L, Catlett R, Blick K, Edgington TS.
Lethal E. coli septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody.
Circ Shock. 33:127-34 (1991)

- Taylor FB Jr, Chang AC, Peer GT, Mather T, Blick K, Catlett R, Lockhart MS, Esmon CT.
DEGR-factor Xa blocks disseminated intravascular coagulation initiated by Escherichia coli without preventing shock or organ damage.
Blood. 78:364-8 (1991)
- Taylor FB, Chang AC, Peer G, Li A, Ezban M, Hedner U.
Active site inhibited factor VIIa (DEGR VIIa) attenuates the coagulant and interleukin-6 and -8, but not tumor necrosis factor, responses of the baboon to LD100 Escherichia coli.
Blood. 91:1609-15 (1998)
- Terada M, Kelly EA, Jarjour NN.
Increased thrombin activity after allergen challenge: a potential link to airway remodeling?
Am J Respir Crit Care Med. 169:373-7 (2004)
- Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM, Stanton JJ, Broze GJ Jr.
Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality.
Blood. 88:1583-7 (1996)
- Versteeg HH, Ruf W.
Emerging insights in tissue factor-dependent signaling events.
Semin Thromb Hemost. 32:24-32 (2006)
- Versteeg HH, Schaffner F, Kerver M, Ellies LG, Andrade-Gordon P, Mueller BM, Ruf W.
Protease-activated receptor (PAR) 2, but not PAR1, signaling promotes the development of mammary adenocarcinoma in polyoma middle T mice.
Cancer Res. 68(17):7219-27 (2008b)
- Versteeg HH, Schaffner F, Kerver M, Petersen HH, Ahamed J, Felding-Habermann B, Takada Y, Mueller BM, Ruf W.
Inhibition of tissue factor signaling suppresses tumor growth.
Blood. 111:190-9 (2008a)
- Versteeg HH, Sørensen BB, Slofstra SH, Van den Brande JH, Stam JC, van Bergen en Henegouwen PM, Richel DJ, Petersen LC, Peppelenbosch MP.
VIIa/tissue factor interaction results in a tissue factor cytoplasmic domain-independent activation of protein synthesis, p70, and p90 S6 kinase phosphorylation.
J Biol Chem. 277:27065-72 (2002)
- Virmani R, Guagliumi G, Farb A, Musumeci G, Grieco N, Motta T, Mihalcsik L, Tespili M, Valsecchi O, Kolodgie FD.
Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious?
Circulation. 109:701-5 (2004)
- Walsh JD, Geczy CL.
Discordant expression of tissue factor antigen and procoagulant activity on human monocytes activated with LPS and low dose cycloheximide.
Thromb Haemost. 66:552-8 (1991)

- Wegmann M, Göggel R, Sel S, Erb KJ, Kalkbrenner F, Renz H, Garn H.
Effects of a low-molecular-weight CCR-3 antagonist on chronic experimental asthma.
Am J Respir Cell Mol Biol. 36:61-7 (2007)
- Yamada Y, Rothenberg ME, Lee AW, Akei HS, Brandt EB, Williams DA, Cancelas JA.
The FIP1L1-PDGFR α fusion gene cooperates with IL-5 to induce murine hypereosinophilic syndrome (HES)/chronic eosinophilic leukemia (CEL)-like disease.
Blood. 107:4071-9 (2006)
- Yarovaya GA, Blokhina TB, Neshkova EA.
Contact system. New concepts on activation mechanisms and bioregulatory functions.
Biochemistry (Mosc). 67:13-24 (2002)
- Zee RY, Cook NR, Cheng S, Erlich HA, Lindpaintner K, Lee RT, Ridker PM.
Threonine for alanine substitution in the eotaxin (CCL11) gene and the risk of incident myocardial infarction.
Atherosclerosis. 175:91-4 (2004)
- Zheutlin LM, Ackerman SJ, Gleich GJ, Thomas LL.
Stimulation of basophil and rat mast cell histamine release by eosinophil granule-derived cationic proteins.
J Immunol. 133:2180-5 (1984)
- 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. 281:603-9 (2001)
- Zimmermann N, Hershey GK, Foster PS, Rothenberg ME.
Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13.
J Allergy Clin Immunol. 111:227-42; quiz 243 (2003)

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. B. Engelmann für die Themenstellung zu dieser Arbeit, die Unterstützung und Beratung bei der Durchführung der Experimente und die Durchsicht dieser Arbeit an deren Gelingen er einen großen Anteil hat. Durch seine freundliche Unterstützung konnte ich diese Arbeit in einer wissenschaftlichen Zeitschrift veröffentlichen. Darüber hinaus hätte ich ohne ihn meinen Ehemann nicht kennen gelernt.

Desweiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Pohl vom Physiologischen Institut und Herrn Prof. Seidel und seinem Nachfolger Herrn Prof. Vogeser vom Institut für klinische Chemie für die Bereitstellung der technischen Geräte in den Räumlichkeiten im Physiologischen Institut und in der Klinischen Chemie im Klinikum Großhadern.

Bei Frau Dr. Ingrid Müller möchte ich mich vor allem für ihre große freundschaftliche Unterstützung im Laboralltag bedanken. Darüber hinaus verdanke ich ihr viele methodische Grundkenntnisse der Laborarbeit.

Außerdem möchte ich Herrn PD Dr. T. Luther, Institut für Pathologie TU Dresden, meinen Dank aussprechen für die Kooperation bei den Double-Sandwich-ELISA-Bestimmungen, sowie für die Bereitstellung von Antikörpern.

Für die Kooperation in der Elektronenmikroskopie danke ich Herrn Prof. E. Morgenstern vom Institut für Molekulare Zellbiologie an der Universität des Saarlandes.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Dr. S. Cuvelier und Prof. K. Patel vom Canada Research Chair in Leukocyte Trafficking, University of Calgary, Canada für die freundliche Zusammenarbeit in Bezug auf die Untersuchungen mit der Transmigrationskammer.

Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei meinen Mitdoktoranden Herr K. Bidzhekov und Herrn D. Manyukan bedanken, die mich bei meinen Untersuchungen freundschaftlich aktiv unterstützt haben.

Mein Dank gilt außerdem allen hier nichtgenannten Mitgliedern des Physiologischen Instituts und des Instituts für klinische Chemie im Klinikum Großhadern, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Zuletzt gilt mein herzlicher Dank meiner Familie, die mir auf dem Weg zu dieser Arbeit zur Seite gestanden hat. Insbesondere bedanke ich mich bei meinem Ehemann Herrn Dr. Andreas Zillmann, der sich mit viel Geduld mit meiner Arbeit auseinandergesetzt hat und mich mit zahlreichen guten Ideen, Kaffee und seelischem Beistand unterstützt hat.